

# **Beiträge zur Herstellung von Hybridkatalysatoren am Modell der Carboanhydrase II**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dipl. Chem.

**Nicola Ursula Sandner geb. Niehage**

aus Münster

Marburg / Lahn 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2008 bis Januar 2015 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Koert am Fachbereich Chemie und von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe am Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg

Als Dissertation am 16.03.2015 angenommen.

Hochschulkennziffer: 1180

Erstgutachter: Prof. Dr. U. Koert

Zweitgutachter: Prof. Dr. G. Klebe

Eingereicht am 16.02.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2015

*für Eineopa*

## ***Danksagung***

Herrn Prof. Dr. Ulrich Koert danke ich für die interessante Themenstellung dieser Arbeit, die mir die Möglichkeit gab, mich in ein neues spannendes und herausforderndes Themengebiet einzuarbeiten, welches noch viel Potential bietet. Außerdem danke ich für die flexible Arbeitsplatzgestaltung und die guten und lehrreichen AK-Seminare.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe danke ich für die herzliche, unkomplizierte Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Möglichkeit, in viele verschiedene Arbeitsfelder einen Einblick zu bekommen, Zeit für fachliche und persönliche Gespräche und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Martina Pfeiffer, der guten Seele im Arbeitskreis, danke ich für viele Chemikalienbestellungen, alle organisatorischen Dinge und die persönlichen ermutigenden Gespräche.

Lydia Hartleben danke ich für alles Organisatorische in der Pharmazie und ihr offenes Ohr für alle „Problemchen“.

Ich danke der Marburg University Research Academy (MARA) für ein Promotionsabschlusstipendium, das mir den Abschluss der Promotion mit Kind deutlich vereinfacht hat.

Ich bedanke mich bei den analytischen Serviceabteilungen der Philipps-Universität Marburg. Der NMR-Abteilung, Dr. Ronald Wagner, Cornelia Mischke und Gerd Häde, danke ich vor allem für viele Phosphor-NMRs - auch in „schlechten“ Zeiten. Frau Dr. Xiulan Xie danke ich für die gute Beratung bei Fragen und Messproblemen. Der Massenabteilung, Dr. Uwe Linne, Jan Bamberger, Florian Kloos und Natalia Fritzlar, danke ich für die ESI-Messungen. Ein besonderer Dank geht an Natalia Fritzlar, die sich immer sorgfältig der Proteinproben angenommen hat. Dr. Klaus Harms und Michael Marsch danke ich für die röntgenkristallographische Messung und Auswertung von Kleinmolekülstrukturen.

Dr. Andreas Heine danke ich für die ausführliche Einführung in die Künste und Tücken der Protein-Kristallographie.

Dr. Holger Steuber und Maren Kuhnert danke ich für einen interessanten, lustigen Synchrotron-Trip zum Bessy nach Berlin.

Der AG von Hänisch, vor allem Michael Feierabend, danke ich für das LiPH<sub>2</sub> in ausreichenden Mengen.

Wolfgang Große, Barbara Mertins, Silke von Horsten und Dr. Georgios Psakis von der AG Essen danke ich für die Betreuung und kompetente Beratung in allen nasschemischen Protein-Kleinmolekül Anknüpfungen und die Möglichkeit, die Reaktionen in der AG Essen durchzuführen und auszuwerten.

Christian Sohn danke ich für die Hilfe beim Pipettieren und Messen des pNPA-Assays.

Meinen Mitstreitern im Click-Projekt, Johannes Schulze Wischeler und Dong Sun, danke ich für die freundliche und konstruktive Zusammenarbeit. Chris Rechlin und Johannes Schulze Wischeler danke ich für alle Unterstützung mit der *hCA II*.

Ich danke den Mitgliedern der AG Klebe, die mich herzlich aufgenommen haben, mir alles „Unbekannte“ eines neuen Fachbereiches und Fachgebietes geduldig erklärt und gezeigt haben.

Ich danke den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des AK Koert für eine schöne Zeit mit und ohne Chemie. Man hat immer einen Ansprechpartner, sowohl für Synthesprobleme, als auch für gemeinsame Unternehmungen, gefunden. An die tägliche Kaffeerrunde, die FB-Fußballturniere und die AK-Kanutouren erinnere ich mich gerne zurück.

Ich danke Julia Baumeister, Mike Dischmann, Boris Hirsch, Jan Roßbach, Tobias Sandner und Julia Schütte für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke meinen Laborkollegen. Christian König, meinem „Laborehemann“, danke ich für vielen persönlichen und chemischen Austausch und Beistand zu Beginn meiner Promotion. Meinen Großraumlabor Kollegen, Julia Baumeister, Mike Dischmann, Boris Hirsch und Dong Sun danke ich für eine lustige Zeit in großer Runde, in der immer Zeit für etwas schwarzen Humor war. Julia Baumeister, Mike Dischmann und Ute Düregger danke ich für die Zeit im „letzten“ Labor im Neubau, die äußerst produktiv und motivierend war.

Ein Dank geht an meine geerbte Labor-Orchidee für ihre finale Blütenpracht.

Ich danke meinen Eltern, dass sie mir durch finanzielle Unterstützung das Studium ermöglicht haben und mich in meinen Entscheidungen immer unterstützt haben.

Ich danke meinem Mann Tobias und meinen Kindern Elisabeth und Manuel, dass sie es mir ermöglicht haben, diese Arbeit fertig zu stellen.

## ***Abkürzungsverzeichnis***

[ $\alpha$ ]	Drehwert
°C	Grad Celsius
Å	Ångström
Ac	Acetat
acac	Acetylacetonat
AChE	Acetylcholinesterase
Amp	Ampicillin
aq.	wässrig
<i>ar</i>	aromatisch
<i>b</i> CA II	<i>bovine</i> Carboanhydrase II
BCN	Bicyclo[6.1.0]nonin
BES	<i>N,N</i> -Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
B-Faktor (Krist.)	Debye-Waller-Faktor
Biot	Biotin
BLUF	Blue-light using FAD
Boc	Butyloxycarbonyl
br	breit (IR, NMR)
brsm	bezogen auf reisoliertes Startmaterial
BSA	<i>bovines</i> Serum Albumin
c	Konzentration
calcd	berechnet (calculated)
Cam	Chloramphenicol
CAST	Combinatorial Active-site Saturation Test
CDI	<i>N,N</i> -Carbonyldimidazol
cod	Cyclooctadien
COSY	<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-correlated spectroscopy
Cp	Cyclopentadien
d	Dublett (NMR)
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMA	Dimethylacetamid

## Abkürzungsverzeichnis

DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
dmbipy	4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin
DME	Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	perdeuteriertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
eq	Äquivalent
ESI	Elektronenspray-Ionisation
Et	Ethyl
et al.	et alii (und andere)
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
F <sub>c</sub>	Calculated structure amplitudes
FC	Flashchromatographie
Fmoc	Fluorenyloxycarbonyl
F <sub>o</sub>	Observed structure amplitudes
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GST	Glutathione-S-Transferase
h	Stunde
<i>h</i> CA II	<i>humane</i> Carboanhydrase II
<i>h</i> CA II-H64C	<i>humane</i> Carboanhydrase II, in der das Histidin an Stelle 64 durch ein Cystein ausgetauscht wurde.
HMBC	<sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C-heteronuklear multiple bond correlation
HMDS	Hexamethyldisilazid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
HTS	High Throughput Screening
Hz	Hertz
I.U.	International unit
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration

## Abkürzungsverzeichnis

IPTG	<i>iso</i> -Propylthio- $\beta$ -galactosid
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	Kopplungskonstante (NMR)
K <sub>a</sub>	Affinitätskonstante
KO <i>t</i> Bu	Kalium <i>tert</i> butanolat
L	Liter
LB-Medium	Nährmedium (Lysogeny broth)
LDA	Lithiumdiisopropylamin
M	Molar
M	Metall
m	Multiplett (NMR)
m	mittlere Intensität (IR)
m	Masse
<i>m</i>	<i>meta</i>
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MES	3-( <i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
mp	Schmelzpunkt
MS	Massenspektrometrie
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
<i>n</i> BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NMR	Kernresonanzspektroskopie
<i>o</i>	<i>ortho</i>
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
<i>olef</i>	olefinisch
<i>p</i>	<i>para</i>
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS-Puffer	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pdb	Protein Datenbank
Ph	Phenyl



## Abkürzungsverzeichnis

ppm	parts per million
PYP	Photoactive yellow protein
q	Quartett (NMR)
<i>q</i>	quartär
quin	Quintett (NMR)
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor (Chromatographie)
RP	Reversed phase (Chromatographie)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
s	starke Intensität (IR)
sat.	gesättigt
SCP	Sterol-carrier Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPAAC	Strain-promoted alkyne-azide cycloaddition
Spec.	specific
T	Temperatur
t	Triplett (NMR)
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TGS	Target-Guided-Synthesis
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Dünnschichtchromatographie (Thin layer chromatography)
Tol	Toluol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trityl (Trt)	Triphenylmethyl
u	Massen-Einheit
UV	Ultraviolett
w	schwache Intensität (IR)
wt%	Gewichtsprozent
X-ray	Elektromagnetische Strahlung
z	Ladung
δ	Chem. Verschiebung (NMR)
λ	Wellenlänge

## Abkürzungsverzeichnis

$\rho$	Dichte
$\sigma$	Das Sigma-Level einer Elektronendichte bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Elektron in dem eingeschlossenen Volumen aufhält.

## Abkürzungen der natürlichen Aminosäuren

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

## ***Inhaltsverzeichnis***

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Zielsetzung.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Literaturübersicht .....</b>	<b>6</b>
3.1. Katalyse-Reaktionen .....	6
3.2. Artificielle Metalloenzyme .....	7
3.2.1. Die ersten artifiziiellen (Metallo)Enzyme .....	10
3.2.2. Nichtkovalente supramolekulare Anknüpfung .....	11
3.2.3. Nichtkovalente dative Anknüpfung.....	17
3.2.4. Kovalente Anknüpfung.....	19
3.2.5. Designte Metalloenzyme .....	23
3.2.6. DNA-basierte Metalloenzyme .....	23
3.3. Optimierungsmöglichkeiten.....	24
3.4. Ausblick .....	25
<b>4. Durchführung .....</b>	<b>27</b>
4.1. Carboanhydrasen.....	27
4.2. Dockingexperimente .....	28
4.3. Biochemische Vorexperimente .....	30
4.4. Tripeptid Testprotein.....	34
4.5. Phosphinsynthese .....	35
4.6. Synthese eines wasserlöslichen Phosphins .....	44
4.7. Kristallisationsansätze.....	60
<b>5. Clickchemie in der Carboanhydrase II .....</b>	<b>61</b>
5.1. Einleitung .....	61
5.2. Durchführung .....	64
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>71</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>77</b>
<b>8. Experimenteller Teil.....</b>	<b>83</b>
8.1. Allgemeine Bedingungen.....	83
8.1.1. Lösungsmittel und Reagenzien.....	83
8.1.2. Puffer und Lösungen für die Proteinexpression .....	84
8.1.3. Chromatographie .....	84
8.1.4. Physikalische Daten.....	85

## Inhaltsverzeichnis

8.2. Versuchsbeschreibungen.....	87
8.2.1. Phosphinsynthese.....	87
8.2.2. Dansylsynthese .....	101
8.2.3. Peptidsynthese .....	106
8.2.4. Synthese eines wasserlöslichen Phosphins .....	116
8.2.5. Proteinexpression und –aufreinigung .....	125
8.2.6. Proteinkristallisation .....	126
8.2.7. Protein-Dansylkupplung .....	127
8.2.8. IC <sub>50</sub> -Wert Bestimmung .....	127
8.3. Kristallstrukturdaten.....	128
<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>143</b>

### ***1 Einleitung***

Mit der Entstehung des Lebens auf der Erde sind innerhalb von Millionen von Jahren eine Vielzahl von Enzymen entstanden, die verschiedenste überlebenswichtige Reaktionen regio-, chemo- und enantioselektiv mit geringem energetischen Aufwand durchführen können. Sie sind oftmals hoch substratspezifisch. Sie setzen Edukte zu Produkten um, liegen danach aber wieder unverändert vor. Wegen dieser Eigenschaften nennt man Enzyme auch Biokatalysatoren. Aufgrund der langen Entstehungsgeschichte sind viele Enzyme hochspezialisiert und effektiv. Sie sind in der Lage alle biochemisch relevanten Reaktionen zu katalysieren.

In der synthetischen Chemie werden und wurden Katalysatoren entwickelt, um bestimmte Reaktionen zu beschleunigen oder erst möglich zu machen. Chemische Katalysatoren haben meist eine größere Substratbreite als Enzyme. Um gute Regio-, Chemo- und Enantioselektivitäten zu erhalten, ist oftmals ein hoher synthetischer Aufwand nötig. Es gibt inzwischen synthetische Katalysatoren für viele verschiedene Reaktionen mit unterschiedlichsten Mechanismen.

Diese beiden Katalysatorwelten, die chemische und die biologische, bergen die Möglichkeit sich gegenseitig zu ergänzen und zu bereichern. Aus dieser reizvollen Idee, die eine große Möglichkeit neuer Katalysatordesigns beinhaltet, ist das Forschungsgebiet der Hybridkatalysatoren entstanden. Innerhalb dieses Gebietes gibt es den Bereich der sogenannten „Artifiziellen Metalloenzyme“. Dabei ist das Ziel einen Übergangsmetallkatalysator mit einem Enzym zu verknüpfen oder ein Übergangsmetall an eine bestimmte Stelle in ein Protein einzubringen. Auf diese Weise erhält das Enzym eine neue katalysierende Eigenschaft und verliert seine natürliche. Die katalysierende Fähigkeit wird durch die chemische Katalysatorseite bestimmt. Die Selektivität kommt von der enzymatischen (biologischen) Katalysatorseite. Die erhaltenen Selektivitäten sind auf die enzymatische Umgebung zurückzuführen, die durch ihre Größe und den definierten dreidimensionalen Aufbau (Tertiärstruktur) dazu in der Lage ist. Auf diese Weise kann das Reaktionsspektrum der Enzyme erweitert und die Selektivität von Übergangsmetallkatalysatoren verbessert werden.

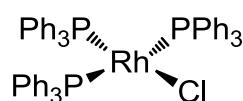
## Einleitung

Von besonderem Interesse ist hierbei aus Blick der chemischen Synthese die Verwendung phosphinhaltiger Übergangsmetallkomplexe, die sich durch effektive Katalyse verschiedener wichtiger Reaktionen wie Hydrierungen oder Hydroformylierungen auszeichnen. Diese Reaktionen werden nicht von Enzymen katalysiert. Verschiedene Arten der Bindung des Phosphins an das Enzym sind vorstellbar, möglich oder bereits umsetzbar. Allerdings stellt die stabile kovalente Anknüpfung eines Phosphinliganden an ein Enzym noch immer eine Herausforderung dar, die im Rahmen dieser Arbeit angenommen und bearbeitet werden soll.

Eine andere Möglichkeit einen Hybridkatalysator herzustellen, ist keinen synthetisch aktiven Katalysator an das Enzym zu binden. Die neu zu katalysierende Reaktion kann allein durch die räumliche Anordnung und Nähe der Reaktanden zueinander stattfinden. Dabei ist es nötig, beide Edukte an das Enzym zu binden. Diese Bindung kann einen kovalenten oder einen nichtkovalenten Charakter haben. Mit dieser Methode ist es möglich Wirkstoffbindung in dem Protein und von dem Protein selber durchzuführen. Das Protein sucht sich die affinsten Edukte aus, um den besten Inhibitor in dem aktiven Zentrum zu synthetisieren. Eine geeignete Reaktion, um zwei Edukte im Enzym zu verbinden ist die *Huisgen*-Cycloaddition, eine der sogenannte Click-Reaktionen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Rahmen eines Kooperationsprojekts der Arbeitsgruppen von Prof. *Klebe* und Prof. *Koert* diesem Ansatz nachgegangen.

## 2 Zielsetzung

Es gibt bereits viele Katalysatoren, um Hydrierungen durchzuführen. Der Katalysator kann entweder heterogen vorliegen, wie beispielsweise Palladium auf Kohle. Die andere Möglichkeit ist eine Katalysatorkomplexreaktion homogen durchzuführen. Als Katalysator für die Hydrierung von gut zugänglichen Doppelbindungen kann beispielsweise der *Wilkinson-Katalysator (1)* eingesetzt werden (Abb. 1).<sup>[1]</sup>



1

**Abb. 1:** *Wilkinson-Katalysator.*<sup>[1]</sup>

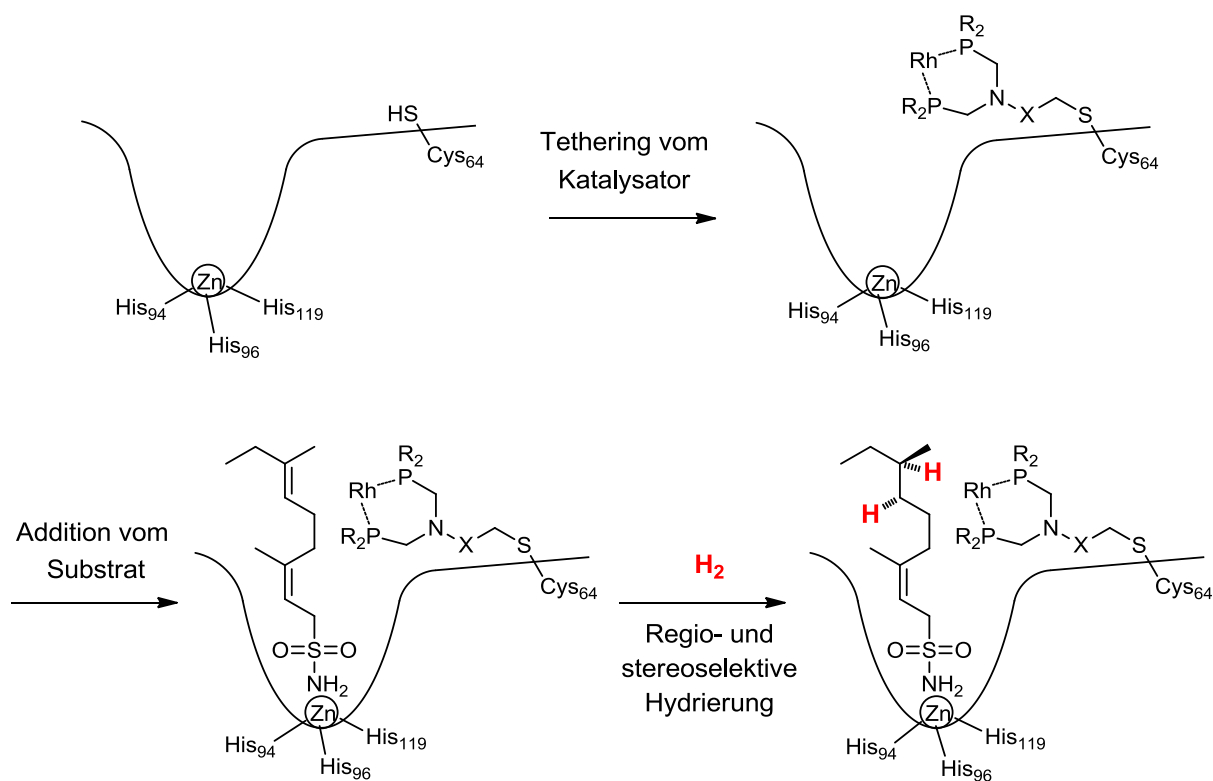
Eine Hydrierungsreaktion, für die es derzeit keinen bekannten Katalysator gibt, ist die regioselektive Hydrierungsreaktion von unfunktionalisierten Polyenen. Die Differenzierung mehrerer chemisch gleicher Doppelbindungen innerhalb eines Moleküls ist bisher nicht möglich. Um dieses spezielle synthetische Problem zu lösen, wurden folgende Überlegungen durchgeführt, mit denen ein Hybridkatalysator entwickelt werden sollte.

Ein bekannter homogener Katalysator für Hydrierungsreaktionen von Olefinen, der aber keine Selektivität besitzt, ist der bereits erwähnte *Wilkinson-Katalysator* (Abb. 1). Es ist ein Komplex aus drei Triphenylphosphin-Liganden und Rhodium(I).<sup>[1]</sup> Verbände man diesen achiralen Katalysator mit einem Enzym zu einem artifiziellen Metalloenzym, könnte das Enzym mit seiner Tertiärstruktur Chiralität induzieren und die gewünschte Selektivität dieser Reaktion erzwingen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte ein solches Hybridkatalysatorsystem hergestellt werden. Als Enzym wurde eine Mutante der *humanen* Carboanhydrase II (*hCA II-H64C*) ausgewählt. Der chemische Katalysator, ein Phosphin-Rhodium(I)-Komplex, sollte kovalent an das Enzym gebunden werden. Dieses System könnte es ermöglichen, eine regio- und stereoselektive Hydrierung von unfunktionalisierten Polyenen durchzuführen.

## Zielsetzung

Die Carboanhydrase II (CA II) besitzt am Grund ihrer aktiven Tasche ein Zink(II)-Ion, welches von drei Histidinen koordiniert ist (Schema 1). Außerhalb der Tasche, aber in räumlicher Nähe des aktiven Zentrums, befindet sich an Stelle 64 ein über Punktmutation eingeführtes Cystein (Cys64).



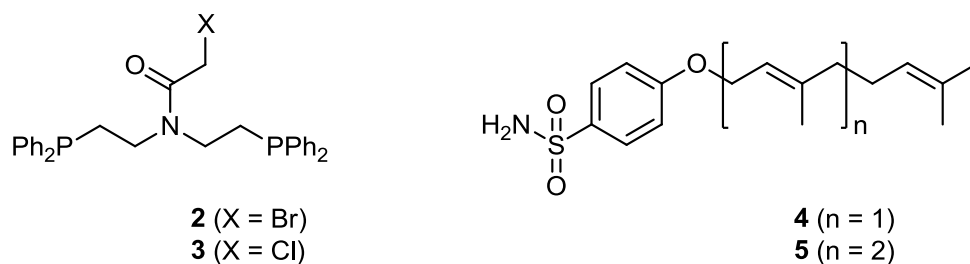
**Schema 1:** Katalysatoraufbaus mit anschließender Hydrierung.

Der Aufbau des Hybridkatalysatorsystems sollte durch die Einführung des Phosphin-Rhodium(I)-Katalysatorsystems über eine kovalente Bindung an das  $Cys_{64}$  erfolgen (Schema 1). In einem folgenden Schritt sollte das Substrat, ein unfunktionaliertes Polyen, in der aktiven Tasche verankert werden. Um das Polyen in der aktiven Tasche zu fixieren, sollte es mit einer terminalen Arylsulfonamid-Gruppe verbunden werden, die eine hohe Affinität zum Zink-Ion in der aktiven Tasche besitzt. Anschließend sollte in einer Wasserstoffatmosphäre die Hydrierung durchgeführt werden. Die gewünschten Selektivitäten sollten von der Enzymumgebung und der dadurch resultierenden relativen Anordnung des Katalysators zum Substrat bestimmt werden.



## Zielsetzung

Zur Darstellung eines solchen Hybridkatalysators wurden die folgenden Moleküle zur Synthese geplant (Abb. 2). Der Katalysator sollte einen bekannten bidentaten Phosphinliganden besitzen, der Hydrierungs- und Hydroformylierungsreaktionen von Olefinen katalysiert.<sup>[2,3]</sup> Der zweite Teil des Ligandensystems sollte eine reaktive Gruppe zur kovalenten Bindung an das Cys64 beinhalten. In der Arbeitsgruppe von Prof. *Koert* wurden bereits erfolgreich Iodacetamide an Cysteine in Proteinen gebunden. Die Iodacetamide wurden jedoch als zu reaktiv eingestuft, da eine intramolekulare Reaktion des Phosphins an das Iodacetamid erwartet wurde. Dies würde in den geplanten Molekülen zu einem begünstigten Sechsring führen. Stattdessen sollte durch die Einführung einer Brom- bzw. Chloracetamidgruppe (**2** und **3**) die Reaktivität herabgesetzt, die intramolekulare Reaktion verhindert, die Reaktion mit dem Cystein jedoch noch ermöglicht werden. Als Übergangsmetall wurde Rhodium(I) gewählt.



**Abb. 2:** Geplante Phosphinliganden (**2**, **3**) und Polyene (**4**, **5**).

Die geplanten Substrate sind auf die unfunktionalisierten Polyene Geraniol und Farnesol zurückzuführen, welche durch die Einführung der terminalen Arylsulfonamidgruppe eine hohe Affinität zur aktiven Tasche aufweisen.

Zu Beginn sollten Dockingexperimente zeigen, ob die geplanten Moleküle in dem Enzym Platz haben und zu einer für die Reaktion sinnvollen Anordnung kommen können. Anschließend sollten die Möglichkeiten getestet werden, die geplanten Moleküle zu synthetisieren und ein solches Katalysatorsystem aufzubauen.

### ***3 Literaturübersicht***

Um einen Überblick über den Beginn, die Möglichkeiten und die Herausforderungen dieses interessanten Forschungsgebietes zu bekommen, soll das folgende Kapitel verschiedene Herangehensweisen und Ergebnisse der Forschung auf dem Gebiet der artifiziellen Metalloenzyme präsentieren. Die ausgewählten Beispiele sollen die Vorreiter auf dem Gebiet vorstellen und dissertationsbezogen in die relevante Literatur einführen. Für einen umfangreicheren Überblick über das gesamte Gebiet der Metalloenzyme, sind viele Reviews veröffentlicht.<sup>[4-13]</sup>

#### **3.1 Katalyse-Reaktionen**

Katalytische Reaktionen können in drei Gruppen eingeteilt werden: die heterogene, die homogene und die enzymatische Katalyse. Jede dieser Katalysearten hat ihre Stärken und Schwächen um synthetische Probleme in der organischen Synthese zu lösen. Im Folgenden soll nur auf die homogene und enzymatische Katalyse näher eingegangen werden, da diese für das Thema signifikant sind.

Um enantiomerenreine Produkte herzustellen, kann eine Racematspaltung oder – atom-ökonomischer – eine enantioselektive Reaktion durchgeführt werden. Die effizienteste und eleganteste Variante ist eine enantioselektive Katalysereaktion. Durch Kombination von Übergangsmetallkomplexen und Biomolekülen entstehen artifizielle Metalloenzyme, die die Eigenschaften aus der Welt der homogenen und der enzymatischen Katalyse kombinieren, und auf diese Weise die Vorteile der jeweils anderen Methode nutzen. In einigen Eigenschaften sind Enzyme und homogene Katalysatoren sehr unterschiedlich, was diese Kombination sehr reizvoll macht (Tabelle 1). Enzymatisch katalysierte Reaktionen verlaufen meist in wässrigen Lösungen, besitzen eine geringe Substratbreite und führen zu nur einem Enantiomer, wobei die Selektivität schlecht umgekehrt werden kann. Homogen katalysierte Reaktionen hingegen finden vor allem in organischen Lösungsmitteln statt, besitzen eine große Substratbreite und es kann oft mit wenig Aufwand die Enantioselektivität umgekehrt werden, so dass beide Enantiomere selektiv erhalten werden können.

	Homogene Katalyse	Enzymatische Katalyse
Enantiomere	Umkehrung der Enantioselektivität gut möglich	Umkehrung der Enantioselektivität schwer
Reaktionsrepertoire	groß	klein
<i>Turnover</i> Nummer	klein	groß
Lösungsmittel	meist organisch	meist wässrig
Optimierung	chemisch	genetisch
Zweite Koordinationssphäre	schlecht definiert	gut definiert
Substratbreite	groß	klein
Typische Substrate	apolar	flexibel

**Tabelle 1:** Unterschiedliche Eigenschaften der homogenen und enzymatischen Katalyse. <sup>[14]</sup>

### 3.2 Artifizielle Metalloenzyme

Die Herstellung artifizieller Metalloenzyme kann zu einer Erweiterung des Reaktionsrepertoires von Enzymen führen, wodurch gleichzeitig die zweite Koordinationssphäre von homogenen Katalysatoren gut definiert wird und neue Selektivitäten in der Reaktionsführung möglich werden. Hier bieten sich vor allem Hydroformylierungsreaktionen, Hydrierungen von Olefinen, allylische Substitutionen, *Heck*-Kupplungen, Cycloadditionen und Olefin-Metathese Reaktionen an. Für diese Reaktionstypen sind keine natürlichen Enzyme zur Katalyse bekannt.

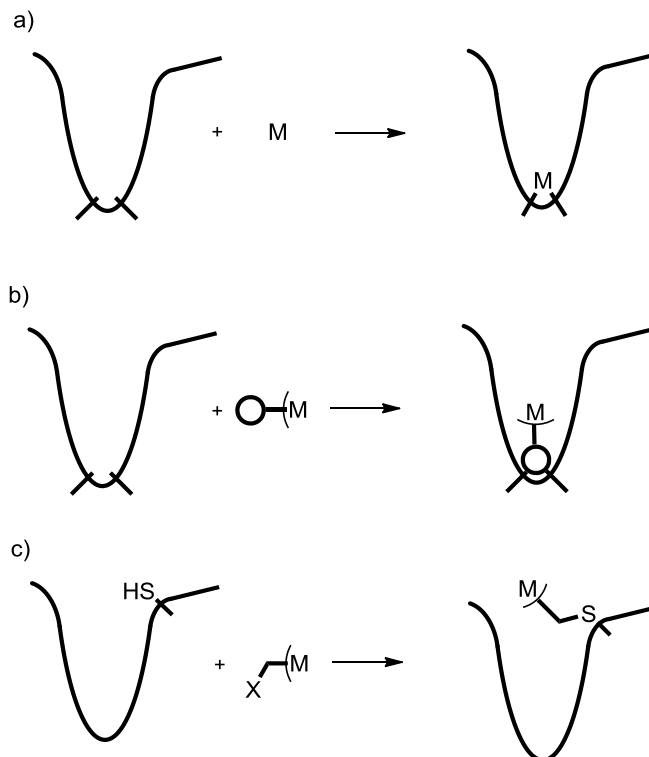
Wie ist ein artifizielles Metalloenzym definiert? Eine klare Definition, die alle Möglichkeiten umfasst, kann an dieser Stelle nicht gegeben werden. Ein artifizielles Metalloenzym sollte nach *Ward* folgende Kriterien erfüllen, die aus seinem Namen hervorgehen. <sup>[12]</sup>

1. Artifizuell: Es muss ein synthetisches Element besitzen, welches eine zusätzliche katalytische Funktion enthält.
2. Metallo: Es muss ein katalytisch aktives Metall besitzen.
3. Enzym: Es muss eine genetisch codierte Komponente besitzen, welche eine genetische Optimierung und gerichtete Evolution möglich macht.

Die Herstellung eines artifiziiellen Metalloenzymes dient nicht nur dem geplanten Katalyseziel, sondern ist ein Prozess, bei dem zusätzliches Wissen erhalten werden kann.

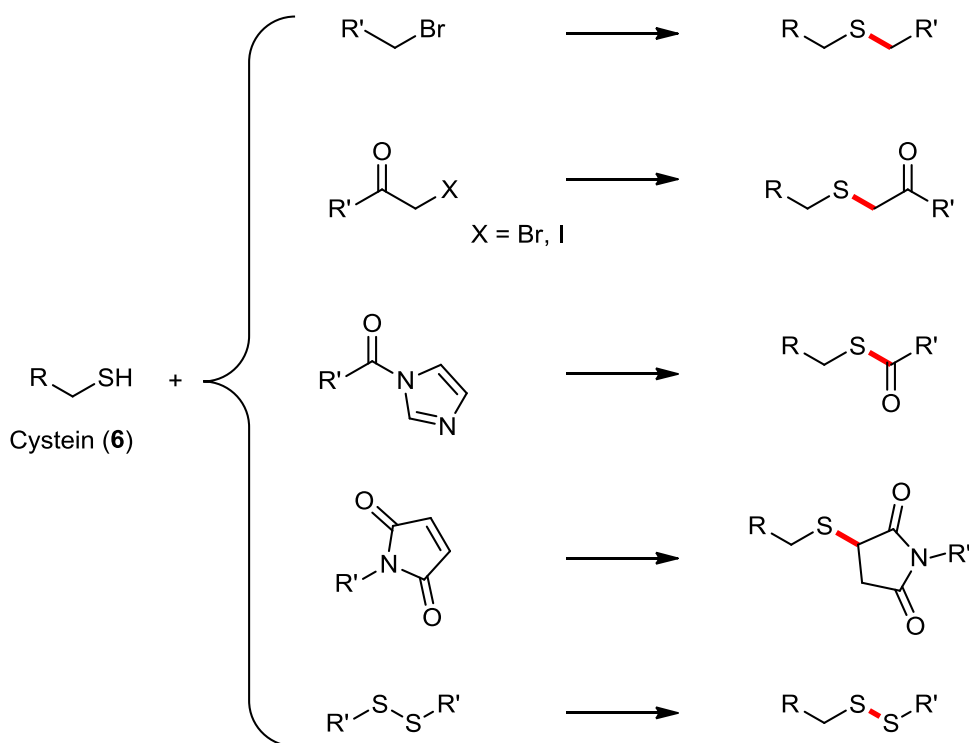
Somit ist es zum Beispiel möglich, durch die Synthese eines artifiziellen Metalloenzym schwache Wechselwirkungen zu der gut definierten zweiten Koordinationssphäre in enantioselektiven homogenen Katalysereaktionen zu erkennen und einen Einblick in die Mechanismen der Katalyse zu erhalten.<sup>[10]</sup> Andere Vorteile ergeben sich durch den modularen Aufbau. Die Trennung der Aktivität, gegeben durch den chemischen Katalysator, von der Selektivität der enzymatischen Umgebung ermöglicht durch die Kombinationsmöglichkeiten und den bio-orthogonalen Katalysatoraufbau eine hohe Diversität.<sup>[14]</sup>

Der chemische Katalysator – der Kofaktor – kann entweder kovalent oder nichtkovalent an das Enzym gebunden werden. Die nichtkovalente Modifikation kann über eine dative oder eine supramolekulare Bindung hergestellt werden (Schema 2). Bei der dativen Bindung wird ein Übergangsmetallatom von Aminosäuren des Enzyms koordiniert, so dass ein neues Metallzentrum entsteht oder das Metallatom eines nativen Metallzentrums ausgetauscht wird. Bei der supramolekularen Bindung wird ein Kofaktor, der das katalytisch aktive Übergangsmetallatom beinhaltet, mit hoher Affinität in einem Enzym eingebunden. Das am häufigsten genutzte System ist das Biotin-Avidin bzw. -Streptavidin Paar, welches eine Affinität von  $K_a > 10^{13} \text{ M}^{-1}$  besitzt.<sup>[10]</sup>



**Schema 2:** Möglichkeiten zur Bindung eines Übergangsmetallatoms an ein Enzym: a) nichtkovalente dative Bindung, b) nichtkovalente supramolekulare Bindung, c) kovalente Bindung eines Metalls oder Metallkomplexes an ein Protein.

Um einen Übergangsmetallkomplex kovalent an ein Enzym zu binden, werden meistens Cysteine genutzt, die sich wegen ihrer Reaktivität und geringen Häufigkeit (1.7% im Enzym) anbieten.<sup>[11]</sup> Allerdings müssen gezielt Cysteine an gewünschten Stellen einmutiert und, falls im Protein an gut zugänglichen Stellen vorhanden, wegmuiert werden. Die Thiolgruppe kann als Nucleophil beispielsweise mit Halogenacetamiden, Alkylhalogeniden oder Maleimiden reagieren (Schema 3). Trotz dieser Möglichkeiten bleibt die Kofaktorsynthese eine Herausforderung. Ein Kofaktor muss auf der einen Seite eine funktionelle Gruppe (Elektrophil) besitzen, um mit dem Cystein zu reagieren, und auf der anderen Seite einen nukleophilen Liganden zur Komplexierung eines Übergangsmetallions enthalten. Zusätzlich muss der Katalysator in Wasser stabil sein und eine zu dem biomolekularen System orthogonale Reaktivität besitzen.<sup>[8]</sup>



**Schema 3:** Biokonjugationsreaktionen für Cystein zur kovalenten Bindung eines Kofaktors an ein Protein.

Um ein artifizielles Metalloenzym zu bilden, ist die katalytische Aktivität des Proteins nicht relevant. Wichtig sind Eigenschaften wie ein hohes Expressionslevel mit gut funktionierender Aufreinigung, Thermostabilität und ausreichender Lösungsmitteltoleranz. Außerdem ist es sinnvoll, ein Protein zu wählen, das eine große Bindetasche besitzt, von dem eine Röntgenkristallstruktur bekannt ist und welches leicht zu kristallisieren ist. Auf diese Weise werden Einblicke in das katalytische System möglich.<sup>[9,13,15]</sup> Die Anknüpfung des Kofaktors

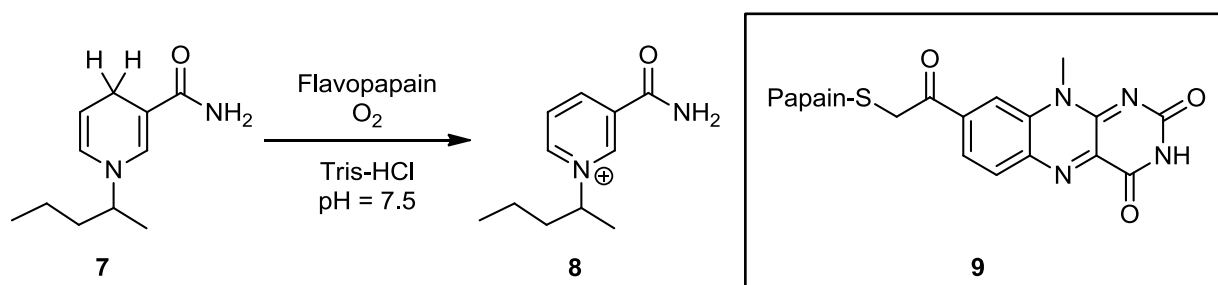
sollte zu keiner Veränderung der Tertiärstruktur führen, jedoch einen signifikanten Einfluss auf die natürliche Aktivität des Proteins haben. Der zu wählende Kofaktor sollte wasserlöslich und achiral sein und als Katalysator in der Nähe des aktiven Zentrums wirken, ohne es zu blockieren. Es ist sinnvoll, vor der Kofaktorsynthese mit einer Computermodellierung zu prüfen, ob ein produktives Zusammentreffen des katalytischen Zentrums mit dem reaktiven Zentrum des Substrats wahrscheinlich ist.<sup>[15]</sup>

Eine mögliche Zielsetzung ist die direkte Hydrierung mit Wasserstoff oder Oxidation mit Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid, die in Enzymen nur indirekt über chemisch anspruchsvolle Kofaktoren wie NADPH oder FADH<sub>2</sub> funktioniert. Solche biologischen Kofaktoren sind für die organische Synthese nicht praktikabel.<sup>[16]</sup>

### 3.2.1 Die ersten artifiziellen (Metallo)Enzyme

Die Vorreiter auf dem Gebiet der artifiziellen (Metallo)enzyme sind *Whitesides* und *Kaiser*, die Ende der 70er Jahre durch erste kovalente und supramolekulare Anknüpfungen von Übergangsmetallkomplexen und Flavinen an Proteine aktive Katalysatoren herstellen konnten.

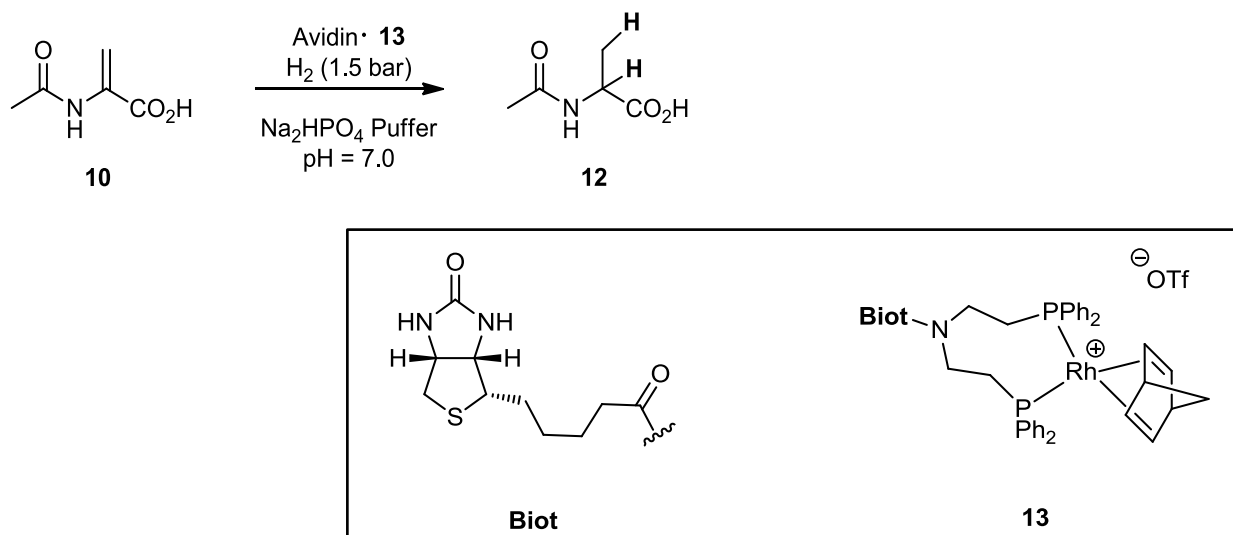
*Kaisers* Gruppe nutzte das Cystein in dem aktiven Zentrum von Papain um kovalent Flavine anzubinden. In der Nähe des aktiven Zentrums besitzt Papain eine größere hydrophobe Einbuchtung, durch die Selektivitäten induziert werden können. Das Flavopapain als neu gebildete Oxireduktase konnte Dihydrornikotinamide und Dithiole oxidieren (Schema 4).<sup>[15]</sup>



**Schema 4:** *Kaisers* ' Oxidation von Dihydrornikotinamid (7) mit der artifiziellen Oxireduktase Flavopapain 9.

*Whitesides* ' Gruppe stellte ein artifizielles Metalloenzym her, welches homogene Hydrierungen mit einem an ein Enzym gebundenen Rhodium-Phosphin-Komplex

katalysieren konnte. Hierzu wurden Biotin-Phosphin-Komplexe hergestellt, die supramolekular an Avidin gebunden wurden. Der so entstandene Katalysator konnte mit mäßiger Enantioselektivität *N*-Acetamidoacrylsäure (**10**) zu *N*-Acetylalanin (**11**) in Wasserstoffatmosphäre reduzieren (max. 41% *ee*, Schema 5).<sup>[2,17]</sup>



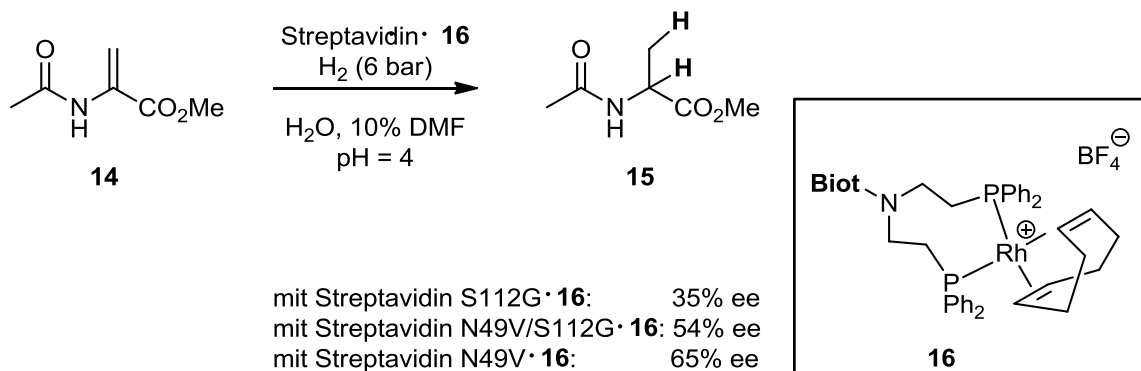
**Schema 5:** Whitesides' Reaktion von *N*-Acetamidoacrylsäure (**10**) mit dem artifiziellen Metalloenzym Avidin·**13**.

### 3.2.2 Nichtkovalente supramolekulare Anknüpfung

Das Biotin-Avidin-System wurde von *Reetz* und *Ward* aufgegriffen und mit zwei verschiedenen Ansätzen weiterentwickelt. Von beiden Gruppen wurde das System von Avidin auf Streptavidin übertragen, welches mit gleicher Affinität wie Avidin an Biotin bindet, jedoch besser zu exprimieren ist. Strukturell liegen beide Proteine als Homotetramer vor und besitzen 30% Sequenzidentität bzw. 42% Sequenzähnlichkeit. Streptavidin ist sehr hitzestabil. Es kann einige Minuten auf 110 °C erhitzt werden ohne zu denaturieren. Zusätzlich besitzt der Streptavidin/Biotin-Komplex eine hohe Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln. In 50%iger alkoholischer Lösung bleibt der Komplex in Lösung.<sup>[12]</sup>

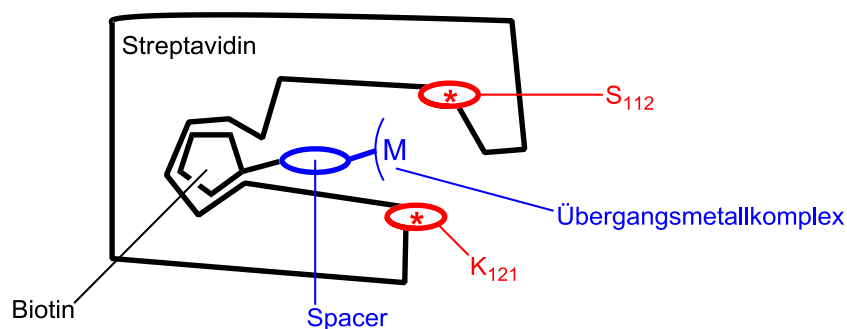
*Reetz* entwickelte die Optimierungsmethode der gerichteten Evolution.<sup>[18]</sup> Anstatt alle Aminosäuren des ganzen Proteins zufällig zu mutieren, wurden nur Aminosäuren in der Nähe des Metallzentrums verändert, die über Computermodellierung bestimmt wurden. Diese Methode wird CAST (*Combinatorial Active-site Saturation Test*) genannt. Es wurden drei Zyklen von Mutation und anschließendem *Screening* durchgeführt. Als Substrat wurde statt

der freien Säure der Methylester eingesetzt, da das entstehende Produkt leichter über Gaschromatographie analysiert werden konnte. Der Wildtyp führte in 23% *ee* zum *R*-Enantiomer, die erste Mutante Ser112Gly zu 35% *ee*, die zweite Mutante Asn49Val/Ser112Gly zu 54% *ee* und die dritte Mutante Asn49Val, bei der die Stelle 112 zurückmutiert wurde, zu 65% *ee* (Schema 6).<sup>[19]</sup>



**Schema 6:** Reetz' Reaktion von  $\alpha$ -Acetamidoacrylsäuremethylester (**14**) mit dem artifiziellen Metalloenzym Streptavidin-**16**.

Ward nutzte als Substrat für seine chemogenetische Optimierung *N*-Acetamidoacrylsäure (**10**), wie Whitesides, und zusätzlich *N*-Acetamidozimtsäure (**17**) (Schema 7).<sup>[20]</sup> Bei der Übertragung der Reaktionsbedingungen von Avidin auf Streptavidin wurde (*R*)-*N*-Acetamidoalanin (**11**) in 94% *ee* bei quantitativem Umsatz erhalten. Es wurden auf der chemischen und auf der enzymatischen (genetischen) Seite Änderungen durchgeführt, die wieder zusammengefügt evaluiert werden sollten. Wie bei Reetz wurde Serin 112 ausgewählt, da es, begründet auf Computermodellierungen, am dichtesten am Rhodiumion liegen soll. Die Stelle 112 wurde mit allen anderen 19 Aminosäuren variiert. Die chemische Optimierung wurde sowohl am Spacer als auch am Liganden durchgeführt (Abb. 3).



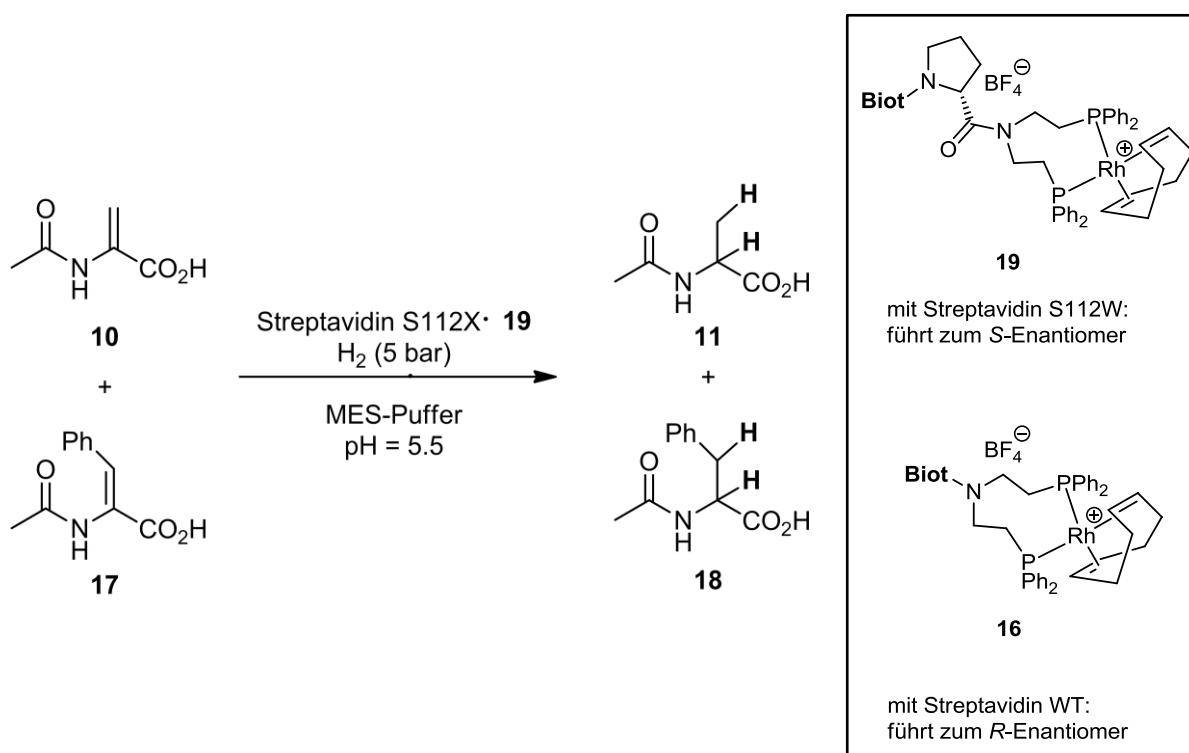
**Abb. 3:** Schematischer Aufbau des artifiziellen Metallokatalysatorsystems mit den verschiedenen Stellen der chemogenetischen Optimierung: Chemische Optimierung: blau; genetische Optimierung: rot, nicht veränderte Stellen: schwarz.



Im *Screening* wurden alle möglichen Kombinationen gleichzeitig an *N*-Acetamidozimtsäure und *N*-Acetamidoacrylsäure (50:50) getestet. Folgende interessante Ergebnisse konnten mit Hilfe dieses *Screening*ansatzes erhalten werden.<sup>[10]</sup>

- Die chemische Optimierung führt zu mehr Diversität als die genetische, so dass die genetische Optimierung auch als *Finetuning* der zweiten Koordinationssphäre bezeichnet werden kann.
- Es ist möglich mit einer Mutation die Enantioselektivität zu invertieren.
- Der flexiblere Ligand führt zu höheren Aktivitäten und Selektivitäten.

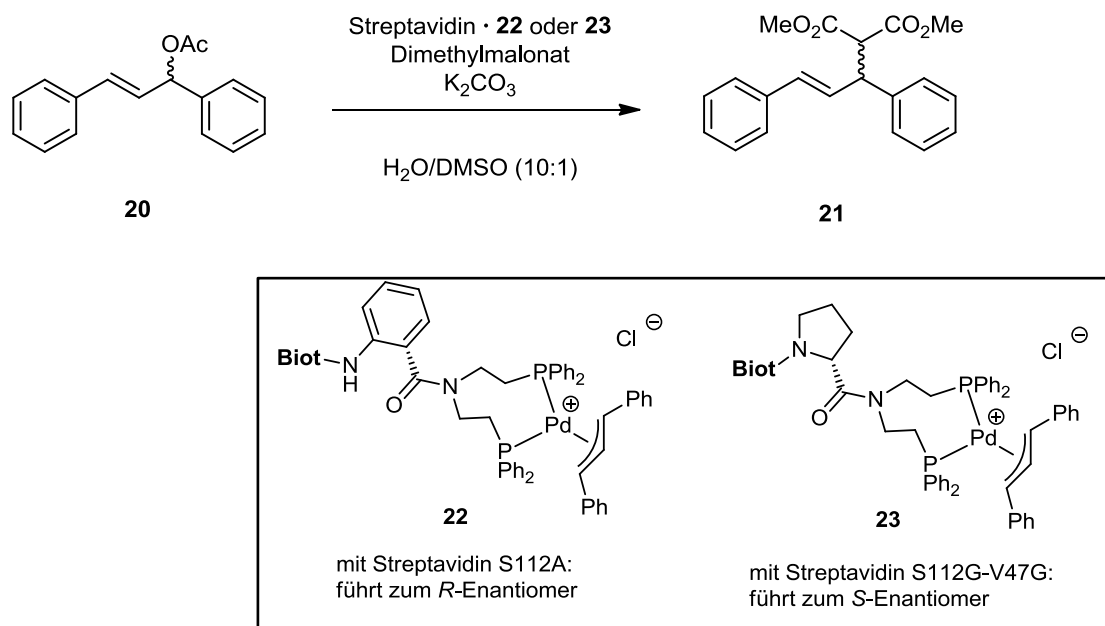
Die optimierten Katalysatoren führten so zu max. 93% *ee* bei 84% Ausbeute (*N*-AcPhe) bzw. 94% *ee* quantitativem Umsatz (*N*-AcAla) für die *R*-Enantiomere und zu 95% *ee* bei quantitativem Umsatz für die *S*-Enantiomere.<sup>[20]</sup>



**Schema 7:** Wards Reaktion der Acrylsäurederivate **10** und **17** mit den artifiziellen Metalloenzymen Streptavidin-**16** und Streptavidin S112W-**19**.

Nach dieser gelungenen Optimierung wurde eine Reaktion ausgewählt, in der einer der Reaktionspartner nicht an das Metall koordiniert. Für die asymmetrische Allylierung von

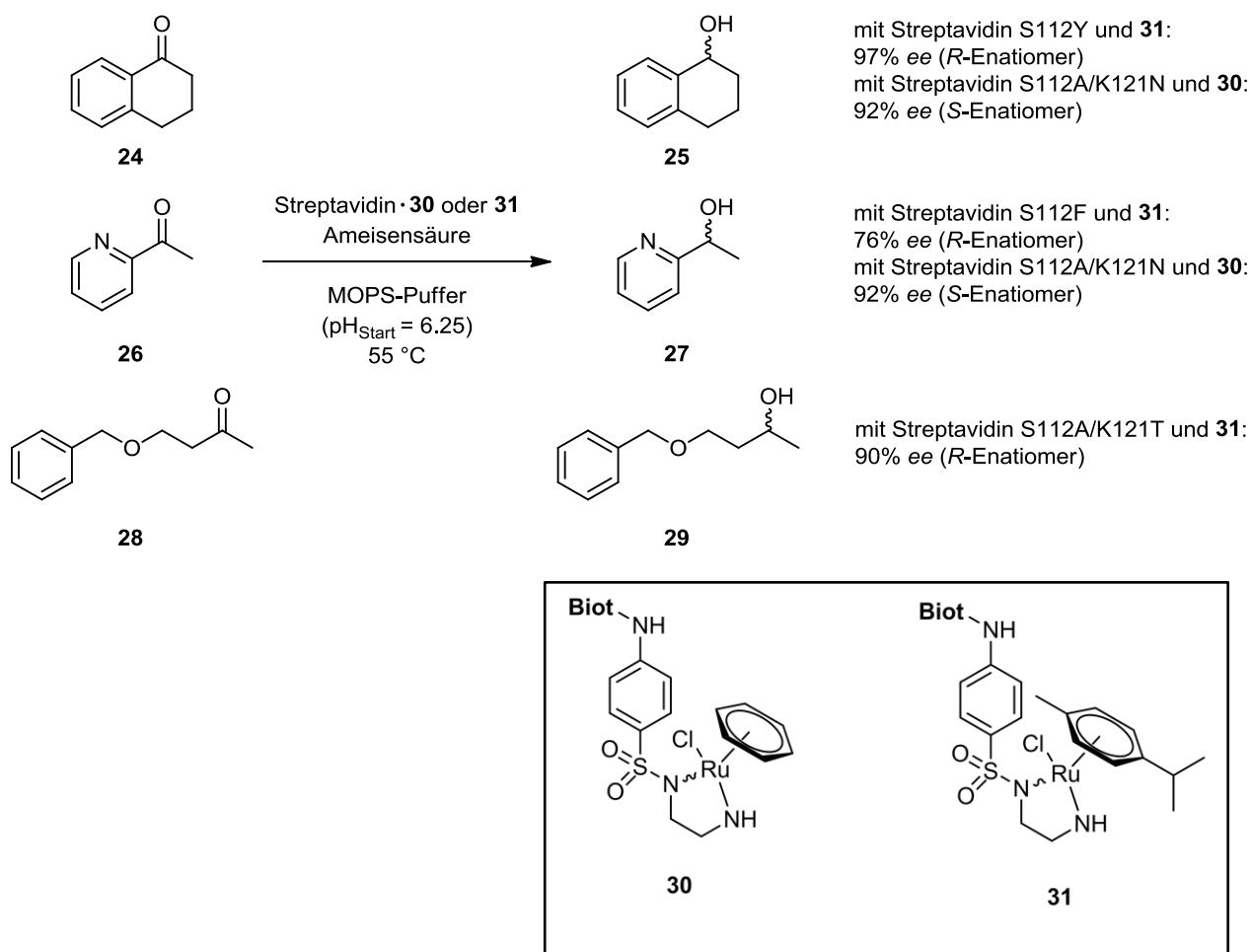
Malonsäuredimethylester (Schema 8) gibt es zusätzlich in der enzymatischen Katalyse kein Äquivalent.<sup>[22]</sup> Für die chemogenetische Optimierung wurden 14 Palladium-Komplexe synthetisiert und mit den vorhandenen S112X-Mutanten von Streptavidin kombiniert.<sup>[23]</sup> Als Substrat wurde 1,3-Diphenylallylacetat ausgewählt.



**Schema 8:** Wards allylische Alkylierung von 1,3-Diphenylallylacetat mit den artifiziellen Metalloenzymen Streptavidin S112A·**22** und Streptavidin S112G-V47G·**23**.

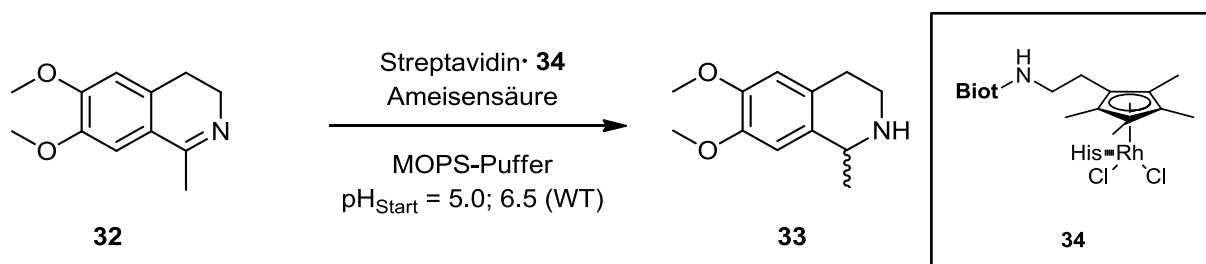
Das *R*-Enantiomer konnte in den optimierten Bedingungen mit 95% *ee* und einer Ausbeute von 90% erhalten werden. Um eine gute Selektivität von 82% *ee* für das *S*-Enantiomer zu erhalten, musste eine zweite Mutation an einer weiter entfernten Stelle V47G eingeführt werden.

Zur Ausweitung des Reaktionsspektrums von Metalloenzym-katalysierten Reaktionen wurde die Transferhydrierung von Ketonen<sup>[23,24]</sup> und Iminen<sup>[25,26]</sup> durchgeführt und chemogenetisch optimiert. Als Katalysator für die Reduktion von Ketonen diente ein Ruthenium-d<sup>6</sup>-Pianostuhl-Komplex. Für Arylketone konnten Enantioselektivitäten von 97% *ee* (*R*) und 92% *ee* (*S*), für Dialkylketone 90% *ee* (*R*) erhalten werden (Schema 9).



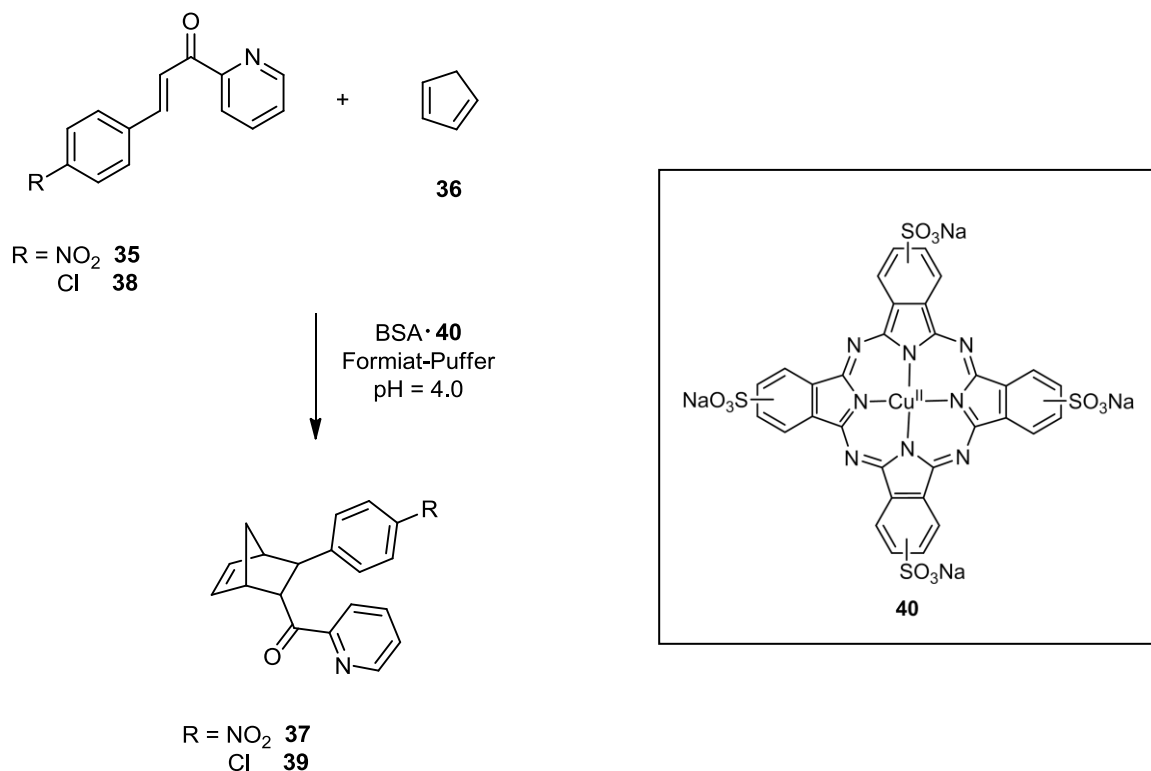
**Schema 9:** Wards Beispiele für die Transferhydrierung von Ketonen mit den artifiziellen Metalloenzymen Streptavidin-**30** oder **31**.

Die Reduktion von Imin **32** zu Salsolidin (**33**) sollte über eine Zweipunktanknüpfung des Kofaktors an das Protein optimiert werden (Schema 10). Die Stellen 112 und 121 wurden über Computermodellierung ausgewählt um ein Histidin einzufügen. Dieses soll an das Übergangsmetall des Katalysators koordinieren, um ihn in einer Position festzuhalten. Als Katalysator wurde ein Cp\*Rhodium-Pianostuhl-Komplex genutzt. Die Selektivität konnte vom Wildtyp (*rac.*) zu den Mutanten S112H (55% *ee*; *S*-Enantiomer) und K121H (79% *ee*; *R*-Enantiomer) verbessert werden. Die Ausbeute konnte von 18% auf einen quantitativen Umsatz gesteigert werden.<sup>[26]</sup>



**Schema 10:** Wards Transferhydrierung von Imin **32** zu Salsolidin (**33**) mit dem artifiziellen Metalloenzym Streptavidin-**34**.

Auch andere Proteine wurden für den Aufbau von artifiziellen Metalloenzymen genutzt, in denen der Katalysator supramolekular angebunden wurde. Reetz et al. haben den Pthalocyanin-Kupfer-Komplex **40** in verschiedene Serum Albumine z.B. *bovines* Serum Albumin (BSA) eingebunden und so einen artifiziellen Katalysator für *Diels-Alder*-Reaktionen hergestellt.<sup>[27]</sup> Bei der Reaktion von Azachalkonen mit Cyclopentadien (**36**) konnte eine *endo-exo*-Selektivität von bis zu 95:5 mit einem *ee* von bis zu 98% für das *endo*-Produkt erreicht werden (Schema 11).

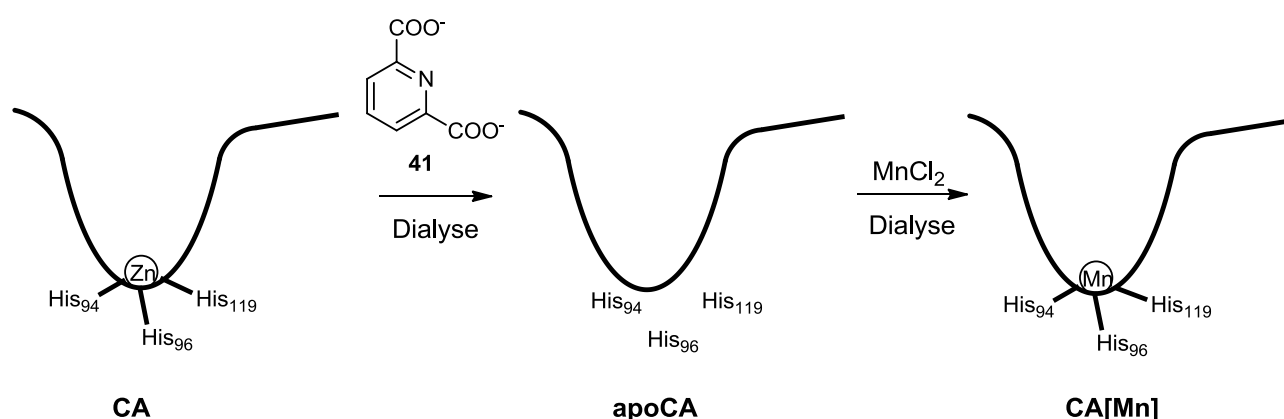


**Schema 11:** Reetz' Diels-Alder-Cycloaddition von Azachalkonen **35** und **38** und Cyclopentadien (**36**) mit dem artifiziellen Metalloenzym BSA-Kupfer-Phthalocyaninkomplex **40**.

Eine weitere verwendete Proteinfamilie sind die Carboanhydrasen. Die Gruppe um Ward nutzte die *humane* Carboanhydrase, um mit Hilfe eines Arylsulfonamidankers einen katalytisch aktiven Ruthenium-Pianostuhl-Komplex supramolekular anzubinden.<sup>[28]</sup> Arylsulfonamide haben eine hohe Affinität zu dem Zink-Ion in dem aktiven Zentrum der hCA II. Mit dem artifiziellen Metalloenzym wurde keine Reaktion durchgeführt.

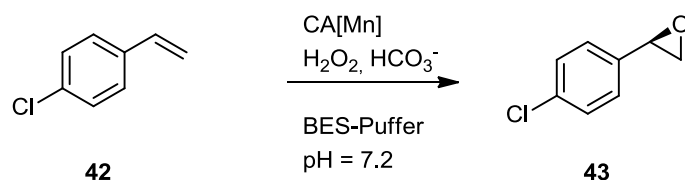
### 3.2.3 Nichtkovalente dative Anknüpfung

Zum dativen Aufbau eines Metalloenzym kann entweder ein Enzym ohne Metallzentrum genutzt werden, oder das bereits enthaltene Metall muss über eine Dialyse entfernt werden, um eine neues einzubringen (Schema 12).



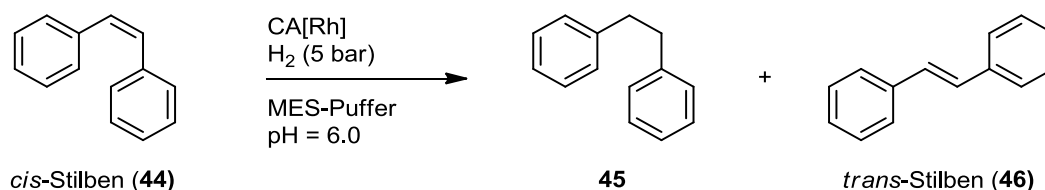
**Schema 12:** Schematische Darstellung der Dialyse von Carboanhydrase gegen den Zinkchelator 2,6-Pyridindicarboxylat (**41**) zu apoCA und anschließender Dialyse gegen MnCl<sub>2</sub> zu CA[Mn].

Die Gruppe von *Kaslauskas* verwendete Carboanhydrasen, um das Zinkion in dem aktiven Zentrum gegen andere Metalle auszutauschen. Zunächst fügten sie Mangan(II) ein, um eine artifizielle Peroxidase herzustellen.<sup>[29]</sup> Mit diesem System war es möglich Styrollderivate mit mäßigen Enantioselektivitäten (max. 67%) und Ausbeuten (max. 43%) zu epoxidieren (Schema 13). Ein zusätzliches Problem dieses Katalysators war die nachlassende Aktivität, die nach vier Stunden einsetzte und auf eine Degradierung des Katalysators zurückzuführen war.



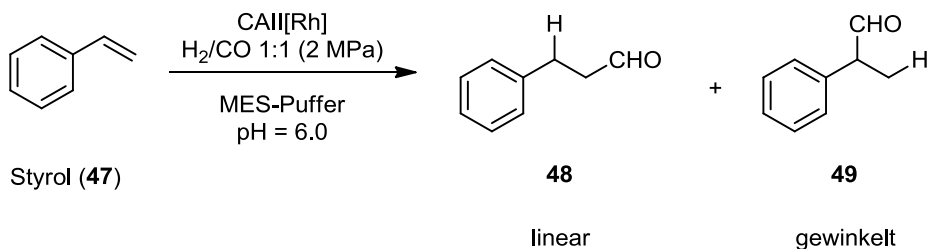
**Schema 13:** Kaslauskas' Epoxidierung von Styrol **42** mit dem artifiziellen Metalloenzym CA[Mn].

Zur Herstellung eines artifiziellen Metalloenzym für Hydrierungen<sup>[16]</sup> oder Hydroformylierungen<sup>[30]</sup> wurde in humaner und boviner Carboanhydrase II das Zink-Ion gegen Rhodium(I) ausgetauscht. Als Rhodiumquelle wurde  $[\text{Rh}(\text{cod})_2(\text{BF}_4)]$  eingesetzt. Man erhielt nicht einen Rhodium(I)-Komplex mit der Stöchiometrie 1:1 pro Enzymmolekül sondern von 6.5 bis 7.5 Rhodium(I)-Komplexen. Die zusätzlichen Rhodium(I)-Ionen wurden an der Enzymoberfläche vermutet, wo Lysine oder Histidine als potentielle Koordinationsliganden vorhanden sind und diese Katalysezentren unselektiv Reaktionen katalysieren könnten. Um die mögliche Koordination des Rhodium(I) an Lysine zu verhindern, wurden alle zugänglichen Lysine acetyliert. Diese Veränderung erhöhte die Anzahl der Rhodium(I)-Ionen auf 10 pro Enzym. Es ist zu vermuten, dass die zusätzlichen Rhodium(I)-Ionen nicht an die Lysine koordiniert werden. In einem nächsten Schritt wurden die exponierten Histidine mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) chemisch modifiziert. Das erhaltene Protein war nicht stabil. Aus diesen Versuchen resultierend, wurden die Histidine an der Oberfläche über ortsspezifische Mutagenese oder über eine Mischung aus drei ortsspezifischen Mutagenesen und sechs chemischen Modifizierungen mit DEPC verändert. Diese Veränderungen führten zu 1.8 (nur ortsspezifische Mutagenese) bzw. 2.3 (Kombination aus ortsspezifischer Mutagenese und chemischer Modifikation) Rhodium(I)-Ionen pro Enzym. Mit den so erhaltenen Enzymen wurde eine Hydrierung von *cis*-Stilben (**44**) durchgeführt (Schema 14). Als Produkte erhielt man das Hydrierungsprodukt Bibenzyl **45**, und das Isomerisierungsprodukt *trans*-Stilben (**46**). Das Rhodium in dem aktiven Zentrum des Enzyms katalysiert hauptsächlich die Hydrierung (80%). Zusätzlich wurde eine Selektivität von *cis*- zu *trans*-Stilben von 20:1 festgestellt, was durch Computermodellierungen unterstützt wurde.<sup>[16]</sup>



**Schema 14:** Kaslauskas' Hydrierung von *cis*-Stilben (**44**) mit dem artifiziellen Metalloenzym CA[Rh].

Die Hydroformylierungsreaktion wurde mit Styrol und dem artifiziellen Metalloenzym *hCA II*[Rh] in einer H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (1:1) durchgeführt (Schema 15). Als Rhodiumquelle wurde [Rh(CO)<sub>2</sub>(acac)] eingesetzt. Eine Mischung aus linearem **48** und gewinkelterm Aldehyd **49** mit einer Selektivität von bis zu 8.4:1 (**48:49**) für das DEPC-modifizierte Enzym *hCAII H4/10R/H17F* [Rh] konnte erhalten werden.<sup>[30]</sup>

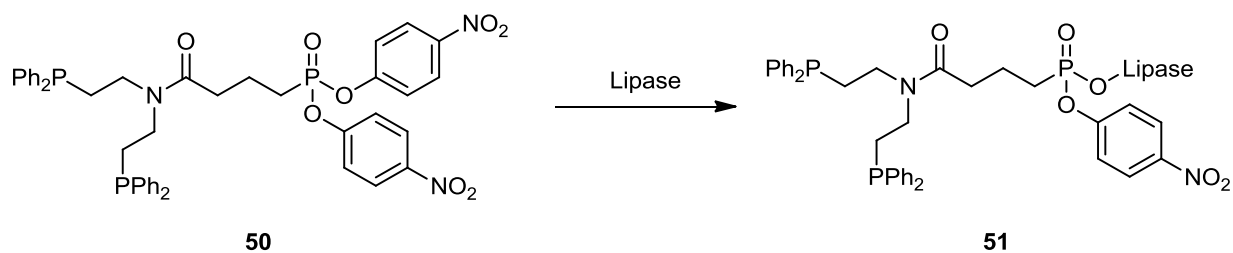


**Schema 15:** *Kaslauskas'* Hydroformylierung von Styrol (**47**) mit dem artifiziellen Metalloenzym CAII[Rh].

### 3.2.4 Kovalente Anknüpfung

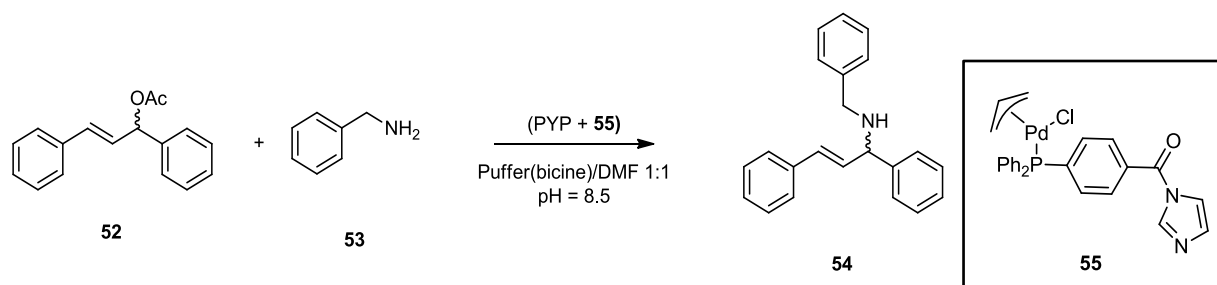
Aufgrund der hohen Nukleophilie des Phosphins sind die meisten Methoden für Cysteinselektive Biokonjugation wie Disulfidbrücken, Alkylierung über Halogenacetamide oder Maleimide inkompatibel (vgl. Schema 3). Sie führen zu einer intramolekularen Reaktion. Bisher wurden in der Literatur erst drei unterschiedliche kovalente Anknüpfungen eines Phosphins an ein Protein vorgestellt.<sup>[31-35]</sup>

Reetz et al. beschreiben 2002 eine kovalente Anknüpfung eines Phosphins über ein Phosphonat, welches an das Serin im aktiven Zentrum von Lipasen bindet (Schema 16).<sup>[31]</sup> Diese Verbindung ist hydrolytisch nicht stabil, was durch die Wiederherstellung der ursprünglichen Enzymaktivität innerhalb eines Tages nachgewiesen werden konnte.



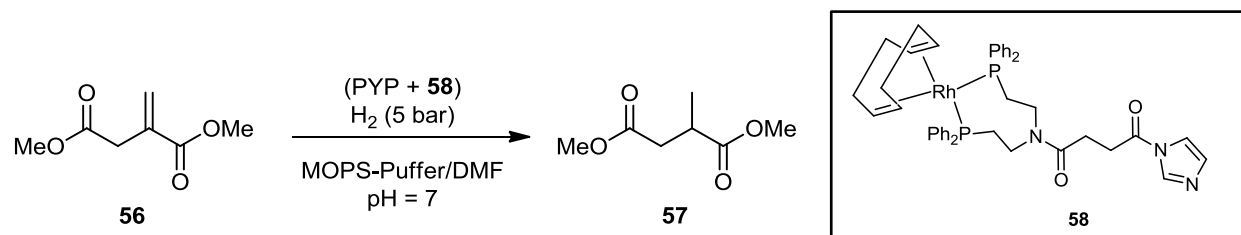
**Schema 16:** *Reetz*‘ kovalente Anknüpfung eines Phosphonats an das Serin im aktiven Zentrum einer Lipase.

Die Gruppe um *Kamer* hat einen Phosphinliganden bzw. einen Übergangsmetall-Phosphin-Komplex über einen Thioester an ein Cystein im photoaktiven Gelbprotein (PYP) gebunden.<sup>[32]</sup> Diese Anknüpfung war über mehrere Wochen bei 4 °C und neutralem pH-Wert stabil. Die Säuregruppe des Kofaktors wurde mit *N,N*-Carbonyldimidazol (CDI) aktiviert und reagierte mit dem Cystein aus PYP zum Thioester (vgl. Schema 3). Das artifizielle Metalloenzym aus einem Palladium-Phosphin-Komplex und PYP konnte eine asymmetrische allylische Aminierung katalysieren (Schema 17). Eine reproduzierbare Umsetzung konnte nur in einer Lösung aus DMF/Wasser 1:1 erhalten werden. Dies führte allerdings zu keinem Enantiomerenüberschuss, weil unter diesen Bedingungen das Protein denaturierte und somit die Tertiärstruktur zerstört wurde.



**Schema 17:** *Kamers* geplante asymmetrische allylische Aminierung von 1,3-Diphenylprop-2-enylacetat (**52**) mit Benzylamin (**53**) mit dem artifiziellen Metalloenzym (PYP+**55**).

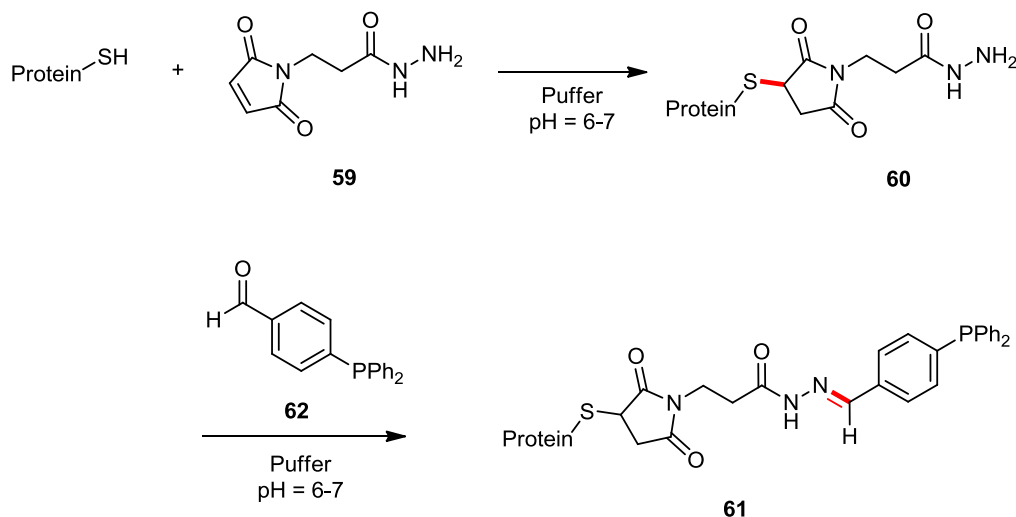
Analog zu dem Palladium-Komplex wurden auch Rhodium- und Ruthenium-Komplexe in PYP über Thioester gebunden.<sup>[33]</sup> Mit dem artifiziellen Rh-Enzym konnte eine Hydrierung von Dimethylitakonon (**56**) durchgeführt werden (Schema 18). Wie bei der Aminierung konnten unter rein wässrigen Bedingungen keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden, da das katalytisch aktive Metallzentrum nicht zugänglich war. Durch Zugabe von organischem Lösungsmittel (DMF) konnte das Metallzentrum zugänglich gemacht werden und die Hydrierung stattfinden. Gleichzeitig wurde die Tertiärstruktur durch das organische Lösungsmittel zerstört. Es konnten keine Enantioselektivitäten induziert werden und die Reaktion lief unselektiv ab.



**Schema 18:** *Kamers* Hydrierung von Dimethylitakonon (**56**) mit dem artifiziellen Metalloenzym (PYP + **58**).

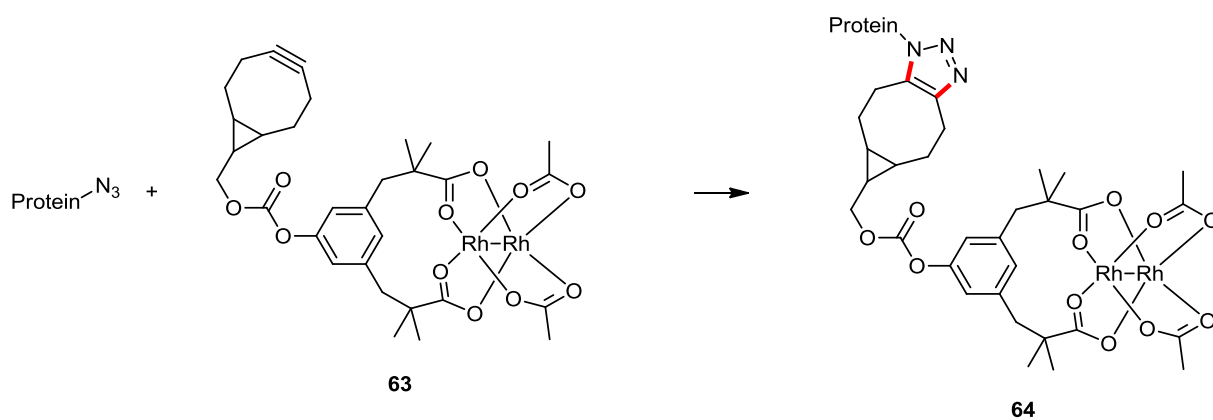


Eine zweistufige kovalente Anknüpfung eines Phosphins an ein Protein wurde ebenfalls von der Gruppe um *Kamer* durchgeführt.<sup>[34]</sup> Zunächst wurde ein Hydrazid **59** über ein Maleimid an das Cystein im Enzym gebunden um anschließend ein Phosphin-Aldehyd **62** an das Hydrazin **60** zu binden (Schema 19). Diese Methode wurde an drei Proteinen – PYP, Sterol-carrier Protein (SCP) und Blue-light using FAD (BLUF) – mit drei Phosphinen und drei Diphosphinen getestet. Die typische Ausbeute betrug mehr als 95%. Allerdings führten einige Diphosphinkonjugate zum Ausfallen des Proteins. Mit einem SCP-Phosphin konnte ein Rhodium-Komplex hergestellt werden, welcher aber nicht in katalytischen Reaktionen getestet wurde.



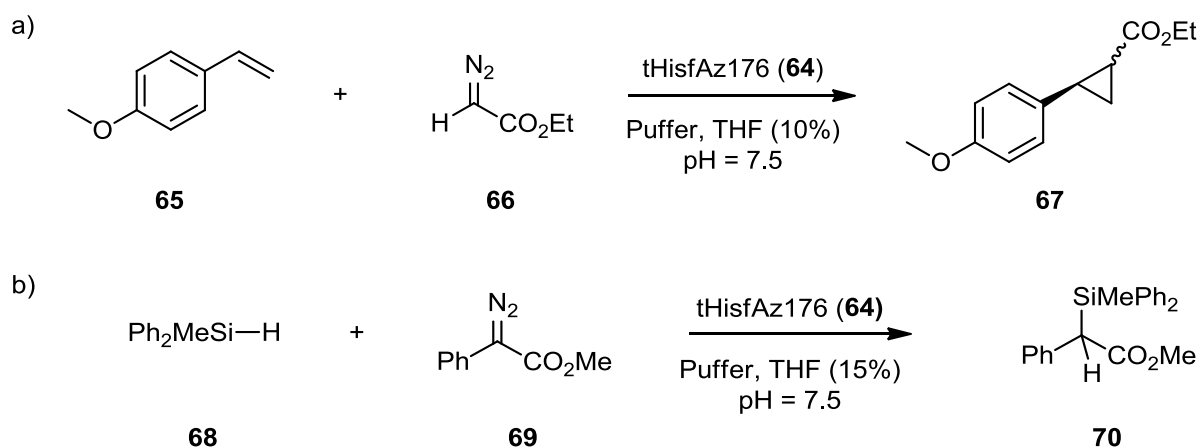
**Schema 19:** *Kamers* Beispiel für die zweistufige kovalente Einführung eines Phosphinliganden.

Eine zweite Möglichkeit der zweistufigen kovalenten Anknüpfung eines Übergangsmetallkomplexes an ein Protein konnte von der Gruppe von *Lewis* gezeigt werden.<sup>[35]</sup> In diesem Ansatz wurden keine Phosphine als Liganden gewählt, sondern Dirhodium-Tetraacetat und Mangan- und Kupfer-Terpyridin als Kofaktoren eingesetzt. Als Methode wurde eine Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) verwendet, bei der einer der Reaktionspartner über eine bioorthogonale Markierung eingeführt wird. Dazu wurde im thermostabilen  $\alpha,\beta$ -Fass Protein tHisF und in einer Phytase ein *p*-Azido-Phenylalanin eingefügt, welches anschließend mit einem Bicyclo[6.1.0]nonin (BCN)-Übergangsmetallkomplex in einer Azid-Alkin-Cycloaddition zu einem Triazol reagierte (Schema 20).



**Schema 20:** Lewis' Beispiel für eine kovalente Anknüpfung eines Übergangsmetallkomplexes an ein Protein über eine Azid-Alkin-Cycloaddition (Click-Reaktion).

Mit dem artifiziellen Rhodium-tHis-Enzym konnte eine Cyclopropanierung (81%) und Si-H Insertion (28%) durchgeführt werden (Schema 21), wobei die Ausbeuten mit dem artifiziellen Metalloenzym als Katalysator geringer waren als mit den Kofaktor allein.<sup>[35]</sup>



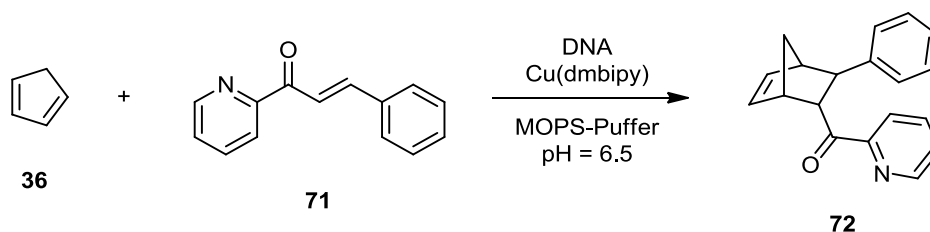
**Schema 21:** Lewis' a) Cyclopropanierung und b) Si-H-Insertion mit einem artifiziellen Metalloenzym

### 3.2.5 Designte Metalloenzyme

Durch *denovo* Design von Metalloenzymen erhofft man sich ein besseres Verständnis wie Metalle in Proteinen funktionieren. Über ein Drittel aller Proteine beinhalten ein essentielles Metallion für biologische Prozesse. Der Gruppe um Pecoraro gelang es ein artifizielles Metalloenzym herzustellen, welches die erste Koordinationssphäre der Carboanhydrase II nachbildet.<sup>[36]</sup> Es besteht aus drei  $\alpha$ -Helizes, die die Koordinationssphäre für zwei Metalle aufbauen. Das aktive Zentrum beinhaltet wie bei der CA ein von drei Histidinen koordiniertes Zink-Ion. Zur Stabilisierung ist zusätzlich ein Quecksilber(II) eingefügt worden, welches dreifach an die Schwefelatome von Penicillaminen koordiniert. Die Hydrolyseaktivität ist mit dem *p*-Nitrophenylacetat-Assay getestet worden und ist nur 100 Mal geringer als die Aktivität der CA II. Die Hydratisierung von CO<sub>2</sub> war 1/500tel so effizient wie bei CA II.

### 3.2.6 DNA-basierte Metalloenzyme

An Stelle von Enzymen können als Biomoleküle auch DNA Doppelhelizes genutzt werden. Der Übergangsmetallkomplex kann über Interkalation oder Bindung an die große Furche eingefügt werden. Im Folgenden soll nur auf ein Beispiel eingegangen werden – die von der Gruppe von Roelfes durchgeführte *Diels-Alder*-Reaktion als eine *Lewis*säure-katalysierte C-C-Bindungsknüpfung.<sup>[37,38]</sup> Als bester Kupfer(II)-Ligand für die Reaktion von Azachalkon (**71**) mit Cyclopentadien (**36**) hat sich 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin (dmbipy) herausgestellt (Schema 22), was zu einer *endo*-Selektivität von > 99% führt. Diese Selektivität konnte trotz moderater Bindungsaffinität des Liganden zur DNA aufgrund der beschleunigenden Wirkung der DNA erhalten werden. Der freie Kupfer-Komplex konnte nicht signifikant zur Produktbildung beitragen.



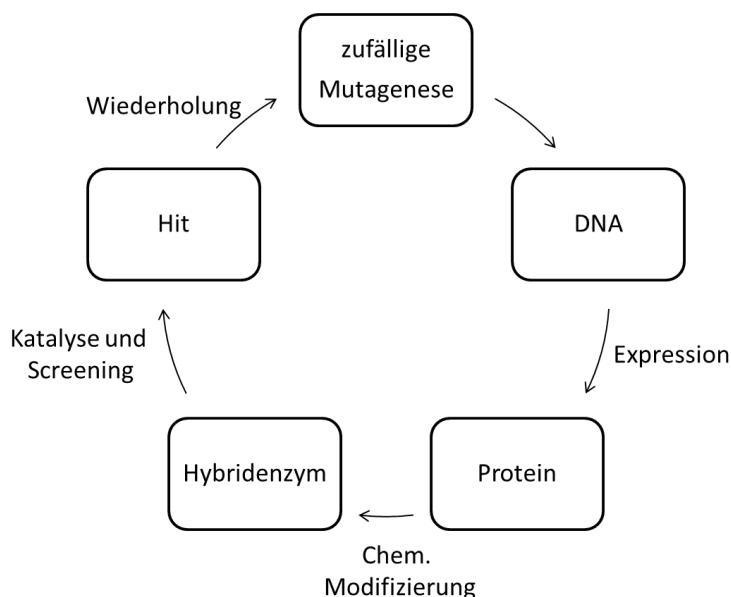
**Schema 22:** Roelfes' *Diels-Alder*-Reaktion von Azacholkon (**71**) mit Cyclopentadien (**36**) mit einer artifiziiellen Metallo-DNA.

### 3.3 Optimierungsmöglichkeiten

Es gibt verschiedene Optimierungsmöglichkeiten, um die Selektivitäten und den Umsatz artifizieller Metalloenzyme zu verbessern. Der Vorteil an dieser Art Katalysatoren ist, dass der chemische Teil (der Übergangsmetallkomplex) und der biologische Teil (Enzym) getrennt voneinander verändert werden können, um anschließend alle daraus resultierenden Kombinationen in einem *Screening* zu testen. Bei allen Optimierungen, die mit einem *Screening* verbunden sind, kann nur ein Katalysator mit den Eigenschaften gefunden werden, nach denen auch gesucht wird.

Bei der *designten* Evolution werden gezielt bestimmte Aminosäuren in einem Protein verändert. Diese werden mit Hilfe von Computermodellierungen oder visueller Inspektion von Kristallstrukturen ausgewählt. Die Auswahl beruht auf Erfahrungen und derzeitigem Wissensstand. Für die *designte* Evolution sind Strukturinformationen des Proteins nötig. Der Ligand des chemischen Übergangsmetallkatalysators ist meist achiral. Dadurch ist die chemische Veränderung oft nicht so synthesesaufwendig. Diese *designte* Evolution als Kombination aus gezielten Mutationen und chemischen Veränderungen des Katalysators wird auch chemogenetischer Ansatz genannt und wurde von *Ward* entwickelt und eingesetzt.<sup>[10]</sup>

Im Gegensatz dazu steht die gerichtete Evolution, die von *Reetz* begründet wurde und als Vorbild die Evolution der Natur hat. *Reetz* begründet diesen Ansatz, der auf einer großen Katalysatorbibliothek aufbaut, dadurch, dass es nicht den universellen Übergangsmetallkatalysator gäbe. Der organische Chemiker benötige für verschiedene Moleküle und Probleme unterschiedliche Katalysatoren, die durch eine große Bibliothek eher abgedeckt werden könnten.<sup>[18]</sup> Für diese Art der Optimierung sind keinerlei Strukturinformationen des Enzyms nötig. Es werden Zufallsmutationen durch z.B. *error-prone PCR* hergestellt und eine Bibliothek von Mutanten erstellt, die zu artifiziellen Metalloenzymen umgesetzt werden und über ein *Screening* bewertet werden (Schema 23).<sup>[21]</sup> Die besten Varianten durchlaufen einen nächsten Zufallsmutations-*Screening*-Zyklus. Dieser Kreislauf wird so lange wiederholt, bis die gewünschten Selektivitäten und Aktivitäten erreicht sind. In diesem Ansatz werden auch weit entfernte Positionen vom aktiven Zentrum verändert. Experimente haben gezeigt, dass auch diese Mutationen einen dramatischen Effekt auf die katalytische Aktivität haben können, der über rationales Design nie bemerkt worden wäre.



**Schema 23:** Gerichtete Evolution von artifiziellen Metalloenzymen.

Eine dritte Möglichkeit ist, Enzyme *in silico* umzugestalten. Mit Hilfe von Computerprogrammen können mögliche neue aktive Zentren oder optimale Positionen für Liganden gefunden werden. Solche Positionen können auch durch visuelle Inspektion von Kristallstrukturen gefunden und mit Hilfe von Computerprogrammen bewertet werden.<sup>[6,11]</sup>

### 3.4 Ausblick

Trotz dieser vielen Entwicklungen auf dem Gebiet der artifiziellen Metalloenzyme, sind die meisten Katalysatoren noch nicht so weit entwickelt, dass sie in der organischen Synthese Anwendung finden, da sie weder mit den natürlichen Enzymen noch mit den besten organischen Katalysatoren mithalten können.<sup>[7]</sup>

Zur Verbesserung der Systeme werden geeignete Genmutationsmethoden und *High-Throughput-Screening*-Systeme benötigt, so dass große Katalysatorbibliotheken schnell erstellt und für spezielle organische Reaktionen in kurzer Zeit gescreent und optimiert werden können.<sup>[18]</sup> Dazu ist auch eine effektive Aufreinigung der Enzyme bzw. der artifiziellen Metalloenzyme nötig.

Zur besseren Vorhersage und dem Design von Metall-Bindungsstellen werden bessere Computerprogramme gebraucht. Die Funktion und Aktivität eines Metallzentrums ist von dessen korrekter geometrischer Umgebung und der sterisch kompatiblen ersten

Koordinationssphäre abhängig, so dass eine gute Vorhersage zu einer hohen gewünschten Aktivität führen sollte.<sup>[6]</sup>

Die zweite Koordinationssphäre, Lösungsmittel, Gegenionen, zugegebene Salze oder Tenside beeinflussen die Enantioselektivität in einer Weise, die noch genauer untersucht werden muss.<sup>[14]</sup> Auch der Einfluss von Wasser, der bei der Überführung in immer niedriger wasserhaltige Lösungsmittel massiv verändert wird, auf die katalytischen Eigenschaften der meist auf wässrige Lösungen optimierten Biomoleküle sollte noch näher erforscht werden.

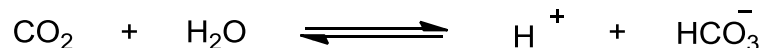
Eine Herausforderung auf der synthetischen Seite ist und bleibt die Kofaktor-Synthese, die durch die Einführung verschiedener funktioneller Gruppen oder der Entwicklung neuer bifunktionaler Systeme Schwierigkeiten beinhaltet.<sup>[13]</sup>

## 4 Durchführung

### 4.1 Carboanhydrasen

Die *humane* Carboanhydrase II (*hCA II*) wurde als Protein für diese Arbeit aus mehreren Gründen ausgewählt. Sie ist gut exprimierbar und aufzureinigen, ist relativ stabil und lässt sich gut kristallisieren. Es sind bereits viele Kristallstrukturen veröffentlicht, und die Arbeitsgruppe von Prof. *Klebe* hat Erfahrung mit der Expression, Aufreinigung und Kristallisation des Proteins.

Carboanhydrasen (EC 4.2.1.1) gehören zur Klasse der Hydrolasen. Mit ihrem Zink(II)-Ion am Grund der aktiven Tasche sind sie den Metalloenzymen zuzuordnen. Sie sind in allen Lebensformen auf der Erde vorhanden und katalysieren die reversible Hydratisierung von CO<sub>2</sub> zu Hydrogencarbonat (Schema 24).<sup>[39]</sup> Diese Reaktion ist pH-abhängig: Bei einem pH-Wert größer als 7 wird CO<sub>2</sub> hydratisiert und Hydrogencarbonat entsteht, bei einem pH-Wert unter 7 kommt es zur Rückreaktion.<sup>[40]</sup>



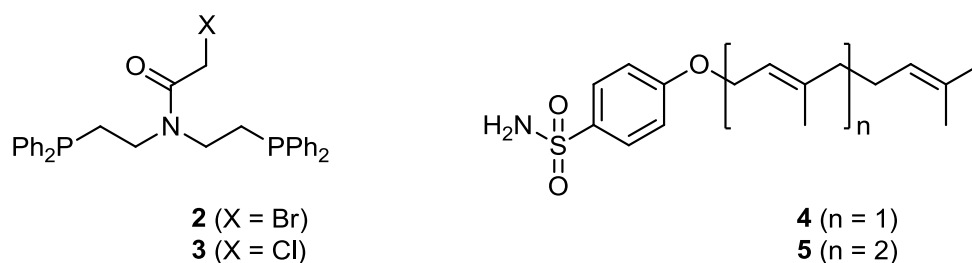
**Schema 24:** Reversible Hydratisierung von CO<sub>2</sub>.

Die *hCA II*, welche in vielen menschlichen Organen vorkommt, gehört mit einer Reaktionsrate von 10<sup>6</sup>/s zu den schnellsten bekannten Enzymen.<sup>[41]</sup> Sie besteht aus 260 Aminosäuren und hat eine Masse von 29.7 kDa. Die aktive Tasche der *hCA II* ist kegelförmig und 15 Å tief. Am Grund befindet sich das katalytisch aktive Zink(II)-Ion, welches von drei Histidinen (His94, His96, His119) koordiniert ist. Die vierte Koordinationsstelle ist im natürlichen Enzym von einem Hydroxid oder einem Wassermolekül besetzt. Die dreidimensionale Struktur des Proteins wurde mittels Röntgenkristallstruturanalyse 1972 von *Liljas* et al. gelöst.<sup>[39]</sup>

Die Punktmutation der in dieser Arbeit verwendeten Mutante der *hCA II* (*hCA II-H64C*) wurde von Dr. *J. Schulze Wischeler* durchgeführt. Mit dieser Mutante wurden bereits in den Arbeitsgruppe von Prof. *Klebe* erfolgreich *Tethering*experimente<sup>[42]</sup> und in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. *Koert* eine Huisgen Cycloaddition<sup>[43]</sup>, eine sogenannte Click-Reaktion, im Enzym durchgeführt (siehe Kapitel 5).

## 4.2 Dockingexperimente

Zu Beginn wurde ein Docking mit dem Programm *GOLD* (v 1.0.1) durchgeführt. Dazu wurden die geplanten Moleküle (Abb. 4) mithilfe von Computermodellierungen in das Enzym eingefügt. Es sollte gezeigt werden, dass die gesamte geplante Anordnung wie in der schematischen Darstellung (Schema 1) in die aktive Tasche der *hCA* II-H64C passt. Mit den Ergebnissen eines solchen Dockings können Aussagen über die Ausrichtung der Moleküle und eventuelle Vorzugskonformationen getroffen werden. Zusätzlich kann die Beweglichkeit der Moleküle im Enzym abgeschätzt werden.

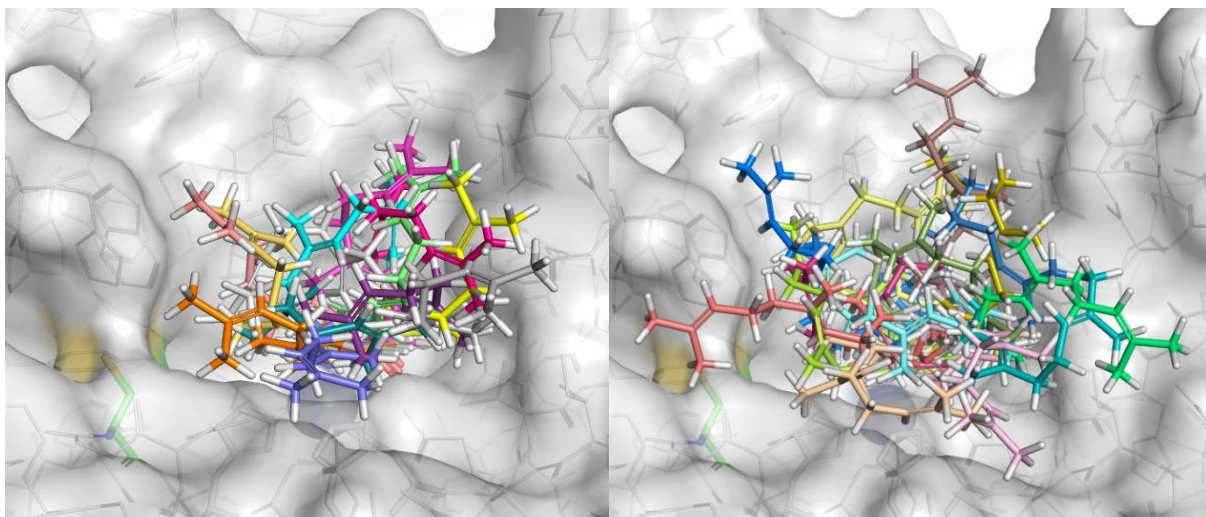


**Abb. 4.** Geplante Phosphinliganden **2** und **3** und geplante Substrate **4** und **5**.

Zunächst wurden die Substrate, Geranyl- (**4**) und Farnesylderivate (**5**), in das Enzym gedockt. Anschließend wurden die Ergebnisse geclustert und diese Cluster einzeln visuell kontrolliert. In einem nächsten Schritt wurde der Katalysator in eine Struktur mit dem Substrat gedockt. Das Katalysatormolekül wurde im Docking wie ein kovalent gebundener Ligand behandelt. Das Katalysatordocking wurde einmal mit einem Cyclooctadien-Liganden am Rhodium und einmal ohne Liganden durchgeführt.

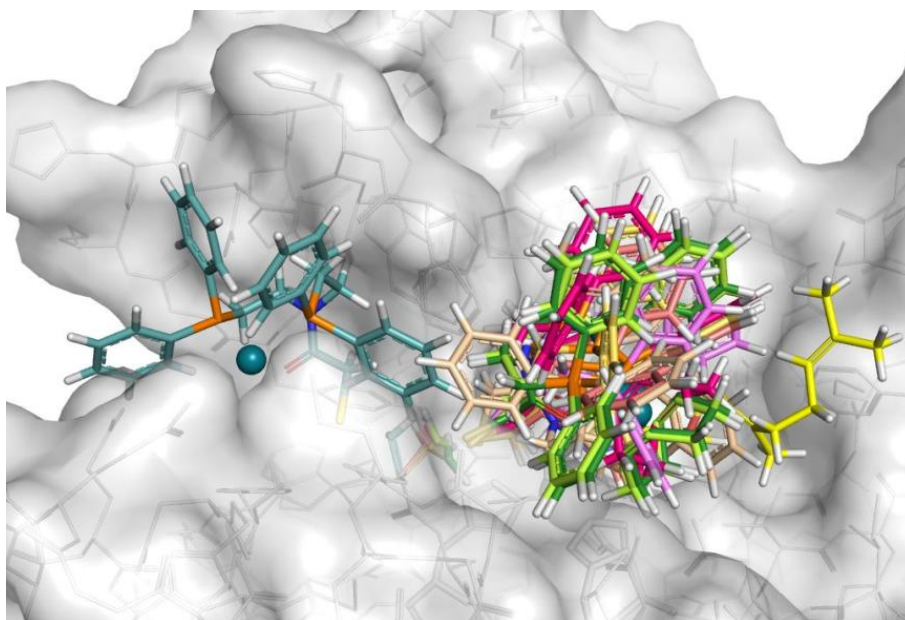
Die Substrat-Docking-Ergebnisse zeigen, dass die Geranyl- und Farnesylderivate durch die Arylsulfonamidgruppe fest an dem Zink(II)-Ion in der aktiven Tasche verankert sind. Durch die Größe der Tasche hat die Polyenkette innerhalb der Tasche keine Vorzugskonformationen, sondern eine hohe Beweglichkeit. Das Farnesylderivat erreicht aufgrund seiner Länge die Oberfläche des Enzyms und hat dort viele Möglichkeiten der Anordnung (Abb. 5 rechts).





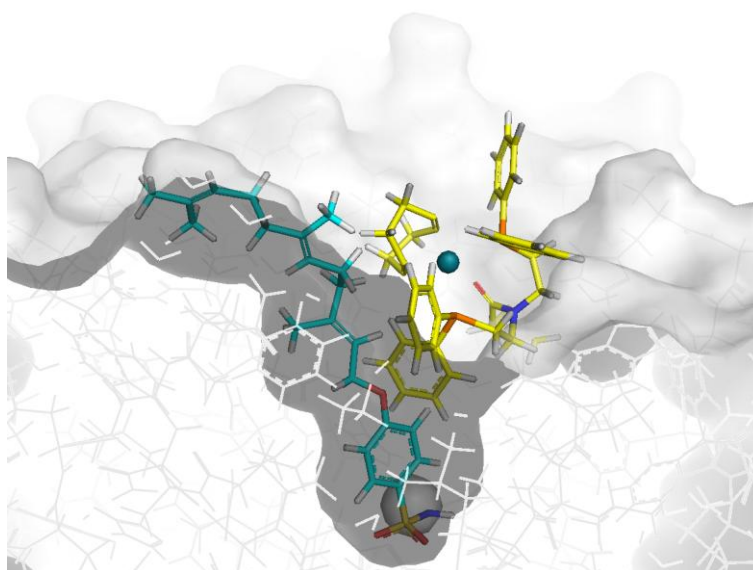
**Abb. 5:** Ergebnis des Substratdockings in *hCA II-H64C*: links: 13 geclusterte Geraniolderivat-Anordnungen; rechts: 14 geclusterte Farnesolderivat-Anordnungen; farbige Aminosäure: Cys64.

Das anschließende Katalysator-Docking zeigt, dass der Rhodium-Phosphin-Komplex zwei unterschiedlich häufige „Haupt“-Konformationen einnehmen kann. Die häufiger auftretende Konformation zeigt in Richtung der aktiven Tasche und somit in Richtung des Substrats. In der zweiten beobachteten Konformation legt sich das Molekül in die entgegengesetzte Richtung, einen Oberflächentunnel (Abb. 6, türkis).



**Abb. 6:** Ergebnis des Katalysatordocking: geclusterte Katalysator-Anordnung; gelb: Farnesol; türkis: Katalysator im Oberflächentunnel.

In Abb. 7 ist eine mögliche Anordnung der beiden Moleküle in der Seitenansicht gezeigt. Das geplante Hydrierungssystem passt in das Enzym. Es ist möglich, dass sich der Katalysator und das Substrat für die Hydrierungsreaktion sinnvoll zueinander anordnen. In diesem Fall befindet sich das Rhodium(I) als katalytisch aktive Spezies zwischen der ersten und zweiten Doppelbindung des Polyens.

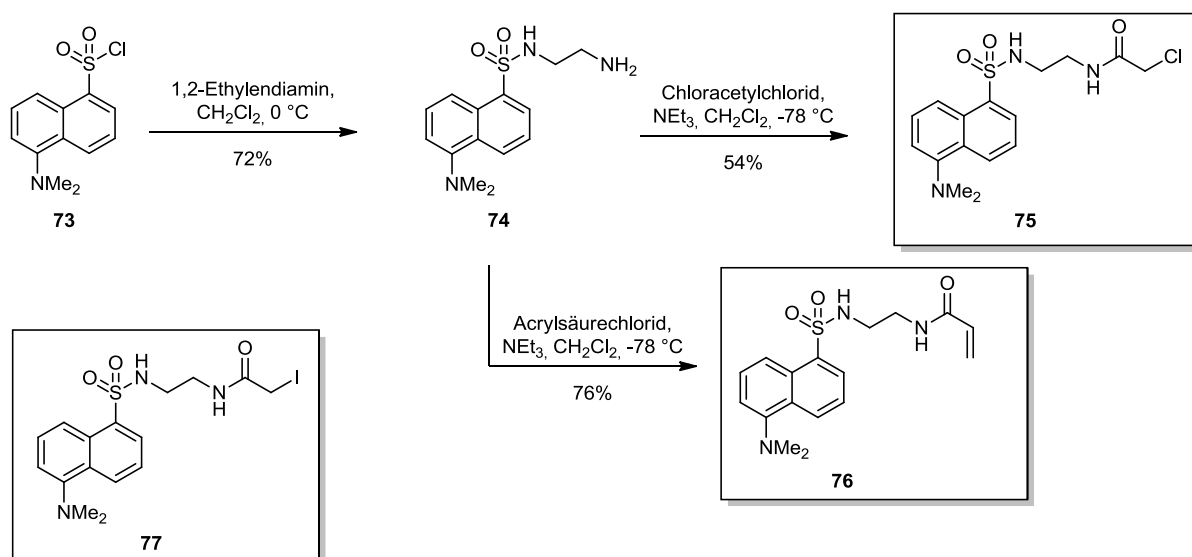


**Abb. 7:** Seitenansicht einer möglichen Katalysator-Substrat-Anordnung in der aktiven Tasche der *hCA II-H64C*: türkis: Farnesolderivat; gelb: Katalysator.

### 4.3 Biochemische Vorexperimente

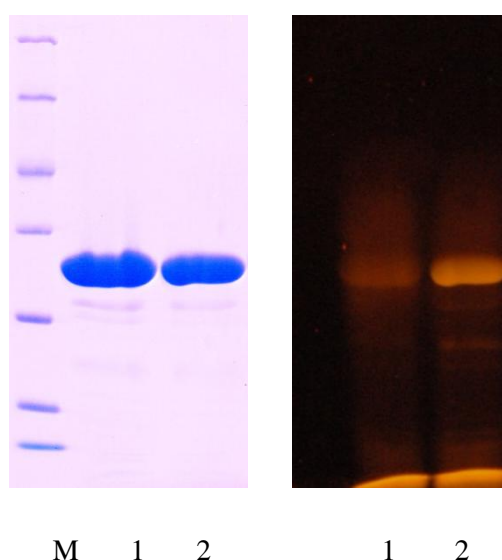
Nach dem Docking wurde getestet, ob das Cys64 mit Iodacetamiden, Chloracetamiden und Acrylamiden reagiert. Diese Testreaktionen wurden mit fluoreszierenden Dansylderivaten durchgeführt (Schema 25). Das Chloracetamid **74** und das Acrylamid **75** wurden synthetisiert. In einem ersten literaturbekannten Schritt wurde Dansylchlorid **73** mit 1,2-Ethylendiamin zum Sulfonamid **74** umgesetzt,<sup>[44]</sup> welches in der folgenden Reaktion in mäßig bis guten Ausbeuten mit den jeweiligen Säurechloriden zum Chloracetamid **75** und Acrylamid **76** umgesetzt wurde. Das verwendete Iodacetamid **77** wurde von Dr. *M. Cebi* hergestellt.

## Durchführung



**Schema 25:** Synthese der Dansylderivate **75**, **76** und **77**.

Die native *hCA* II besitzt bereits ein Cystein an der Stelle 205. In den Anknüpfungsexperimenten sollte herausgefunden werden, ob das neu eingeführte Cys64 selektiv adressiert werden kann. Da das Cys64 im Gegensatz zum Cys205 oberflächenexponiert ist und die Reaktion am intakt vorliegenden Protein stattfindet, sollte die gewünschte Selektivität möglich sein. In ersten Kupplungsversuchen wurden der Wildtyp und die Mutante H64C mit dem reaktivsten Dansylbaustein, dem Iodacetamid **77**, umgesetzt. Im UV-Licht konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp kaum fluoresziert, hingegen bei der H64C-Mutante eine deutliche Bande im UV-Licht zu sehen ist (Abb. 8). Diese Beobachtung zeigt bereits eine Selektivität der Reaktion mit dem Cys64.



**Abb. 8:** SDS-PAGE-Gel der Kupplungsprodukte: links: mit Coomassie-Färbung; rechts: im UV-Licht; M: Marker; 1: *hCA* II; 2: *hCA* II-H64C.

## Durchführung

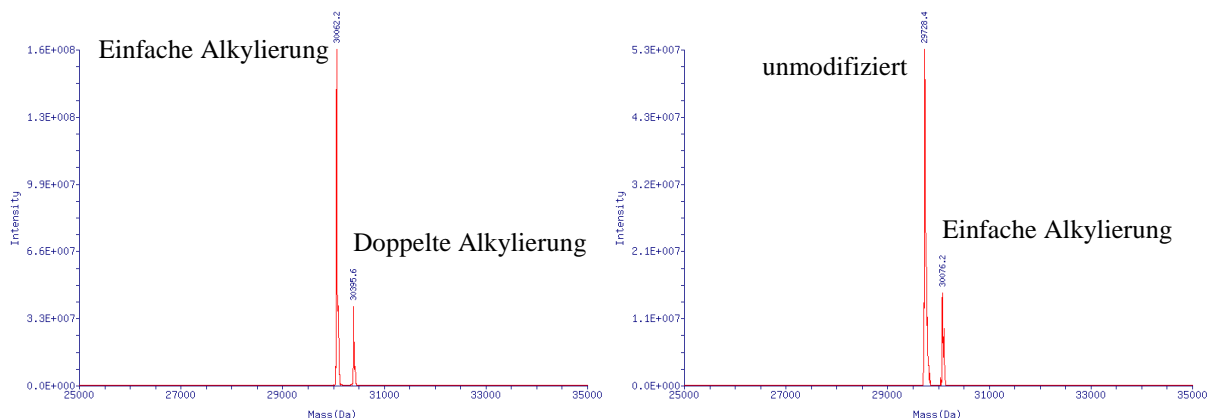
Nach erfolgreicher Iodacetamidkupplung wurden die beiden weniger reaktiven Dansylderivate **75** und **76** eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen wurden variiert. Es wurden Tris- und Phosphatpuffer eingesetzt und unterschiedliche Temperaturen getestet. Bei der Reaktion bei 60 °C zersetzte sich das Enzym. Der Tris-Puffer (pH = 7.0; 7.8) führte zu etwas besseren Ergebnissen als der Phosphatpuffer (pH = 7.2; 7.8) (Tabellen 2 und 3). Bei der Reaktion des Chloracetamids **75** im Phosphatpuffer wurde eine Mischung aus unmodifiziertem, einfach und doppelt alkyliertem Protein erhalten. Diese Produktmischung ist für eine Optimierung in dem Puffersystem ungeeignet. Die Reaktionen wurden mit SDS-PAGE-Gelen und Masseexperimenten (Abb. 9) ausgewertet, was es ermöglichte erstmals Ausbeuten zu bestimmen.

Temperatur	20 °C	37 °C	60 °C
Acrylamid <b>76</b>	0%	21% einfache Alkylierung	Zersetzung
Chloracetamid <b>75</b>	-	81% einfache Alkylierung 19% doppelte Alkylierung	Zersetzung

**Tabelle 2:** Ausbeuten der Kupplungsreaktion in Tris-Puffer.

Temperatur	20 °C	37 °C	60 °C
Acrylamid <b>76</b>	0%	14% einfache Alkylierung	Zersetzung
Chloracetamid <b>75</b>	-	4% unmodifiziert 87% einfache Alkylierung 9% doppelte Alkylierung	Zersetzung

**Tabelle 3:** Ausbeuten der Kupplungsreaktion in Phosphat-Puffer.



**Abb. 9:** Massenspektrum der Kupplungsreaktionen: links: Kupplung mit Dansyl-Chloracetamid **75**; rechts: Kupplung mit Dansyl-Acrylamid **76**.

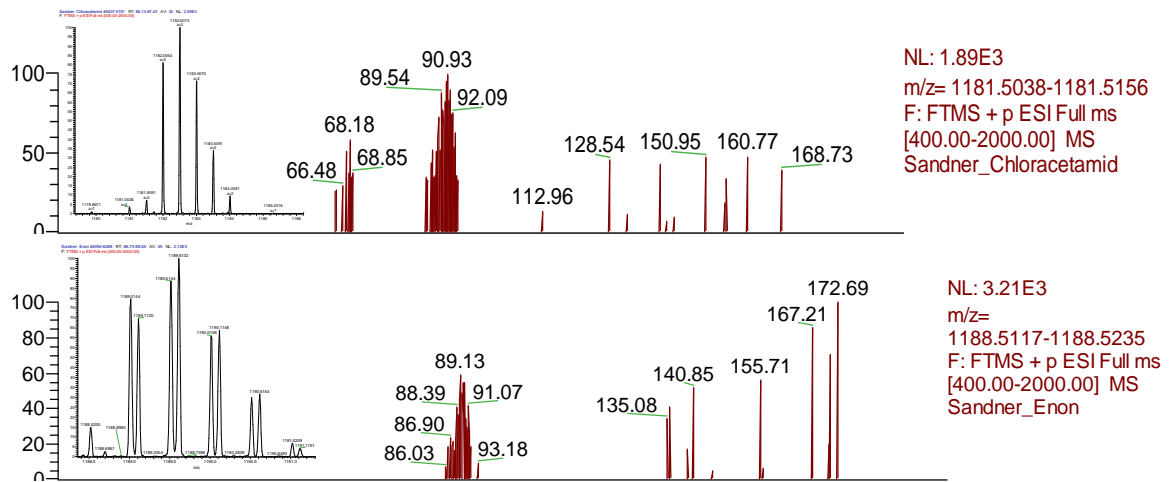
Nach weiteren Optimierungen der Reaktion in Bezug auf pH-Wert, Temperatur und Dansylderivatkonzentration konnten optimierte Reaktionsbedingungen mit Ausbeuten von 75% mit dem Chloracetamid **75** und 40% mit dem Acrylamid **76** erhalten werden (Tabelle 4). Die unerwünschte Alkylierung des Cys205 mit dem Chloracetamid **75** konnte vollständig unterdrückt werden.

Chloracetamid <b>75</b> (~75%)	Acrylamid <b>76</b> (~40%)
Reaktionsbedingungen:	Reaktionsbedingungen:
- 0.1 mM CAIIIH64C	- 0.1 mM CAIIIH64C
- 50 mM Tris, pH = 7.8	- 50 mM Tris, pH = 7.8
- 1 mM Dansyl-Chloracetamid	- 2 mM Dansyl-Acrylamid
- Reaktionszeit: über Nacht	- Reaktionszeit: über Nacht
- T = 20 °C	- T = 37 °C

**Tabelle 4:** Optimierte Reaktionsbedingungen für die Kupplung der Dasylderivate **75** und **76** an *h*CA II-H64C.

## Durchführung

Mit Hilfe eines tryptischen Verdau konnte bestätigt werden, dass der Dansylrest mit dem gewünschten Cystein im Protein reagiert hatte. Die folgende Aminosäuresequenz wurde nach einem tryptischen Verdau in der massenspektrometrische Analyse mit der gewünschten Modifikation gefunden: ILNNG**C**AFNVEFDDSQDK (Abb. 10).



**Abb. 10:** Chromatogramme und Massenspektren des modifizierten Peptids nach dem tryptischen Verdau: oben: Reaktion mit dem Chloracetamid **75**; unten: Reaktion mit dem Acrylamid **76**.

Es konnte gezeigt werden, dass das Chloracetamid **75** in guten Ausbeuten mit der *hCA* II-H64C umgesetzt werden kann. Die doppelte Alkylierung konnte unterdrückt werden, so dass das Cys64 selektiv alkyliert wurde. Auch das Acrylamid **76** reagierte mit dem Cys64 der *hCA* II-H64C, allerdings waren die erreichten Ausbeuten mit 40% geringer. Die Reaktivität der Moleküle hängt aber nicht nur von der reaktiven Gruppe, sondern auch von der Affinität des Restes zum Protein und der relativen Umgebung der aktiven Tasche ab. Daher lassen sich keine eindeutigen Voraussagen über die Reaktion mit dem geplanten Katalysator oder den Phosphinliganden machen.

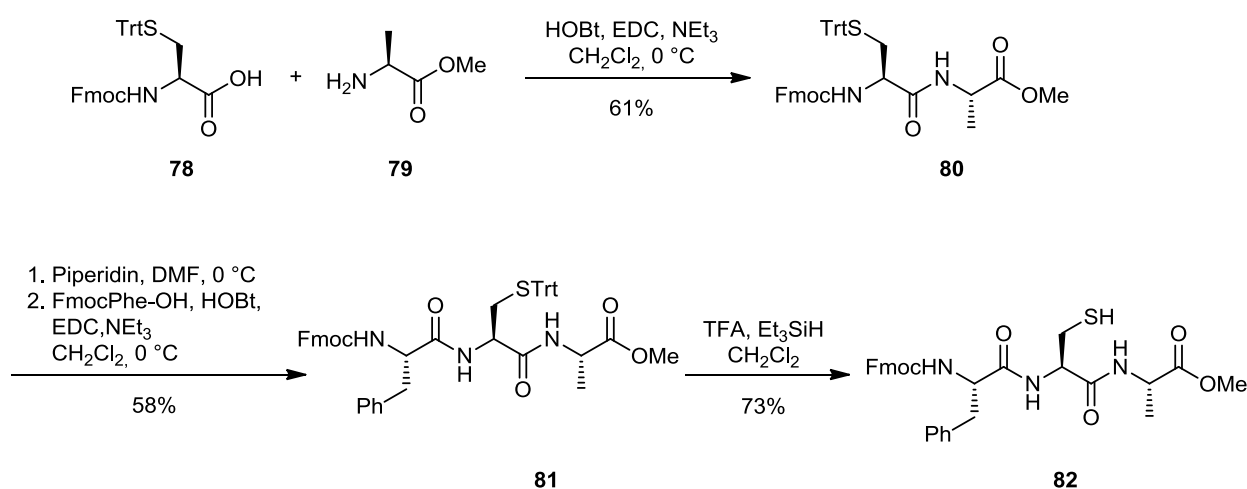
### 4.4 Tripeptid-Testprotein

Als Testsystem für die Anknüpfung des Phosphins an das Protein wurde das Tripeptid **82** entworfen und synthetisiert. Es besteht aus Phenylalanin, Cystein und Alanin. Die Aminosäuresequenz wurde der natürlichen Umgebung des Cys64 in der *hCA* II-H64C

## Durchführung

angepasst. Nur das vor dem Cystein vorkommende Glycin wurde durch die sterisch anspruchsvollere hydrophobe Aminosäure Phenylalanin ersetzt.

Die Tripeptidsynthese begann mit der Kupplung von FmocCys(Trt)-OH (**78**) mit Ala-OMe (**79**) unter Standardbedingungen mit HOBt, EDC und NEt<sub>3</sub>. Das Dipeptid **80** konnte in guter Ausbeute erhalten werden (Schema 26). Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe von **80** mit Piperidin erfolgte die zweite Amidbildung mit FmocPhe-OH zum komplett geschützten Tripeptid **81**. Die Trityl-Gruppe konnte mit TFA und Triethylsilan in guter Ausbeute entfernt werden, so dass das kupplungsfähige Tripeptid **82** mit freiem Cystein erhalten wurde.



**Schema 26:** Synthese des Tripeptids **82**.

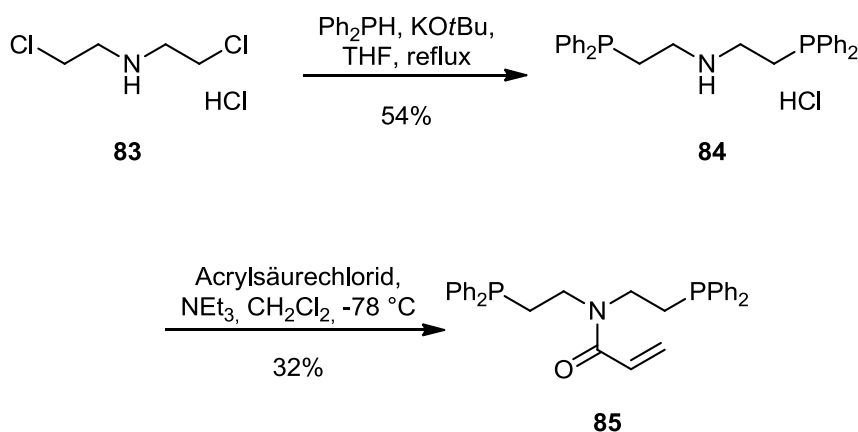
Mithilfe dieses Tripeptids **82** sollte gezeigt werden, dass Peptidbindungen in Gegenwart von Phosphinen stabil sind. Durch die Übersichtlichkeit des Systems im Gegensatz zum ganzen Protein sollten NMR-Analysen des Additionsproduktes und eine genaue Bestimmung der Ausbeute möglich sein.

## 4.5 Phosphinsynthese

Das von Whitesides veröffentlichte Phosphin **85** sollte synthetisiert werden, wobei die reaktive Acrylamidgruppe auch durch andere elektrophile Gruppen ersetzt werden sollte. Die Phosphinsynthese wurde analog zu der Synthese von Whitesides<sup>[17]</sup> geplant. Die erste Stufe zum Bis-Diphenylphosphin **84** sollte wie in der Literatur beschrieben erfolgen und im

darauffolgenden Schritt zusätzlich zu der Acrylamidgruppe eine Chlor- oder Bromacetamidgruppe eingeführt werden.

Die geringe Ausbeute von Acrylamidphosphin **85** (Schema 27) lässt sich auf den Produktverlust während der säulenchromatographischen Aufreinigung aufgrund der Sauerstoffempfindlichkeit des Acrylamidphosphins **85** zurückführen. Whitesides reinigte dieses Phosphin nicht weiter auf, sondern setzte es als Rohprodukt für weitere Experimente ein, um eine oxidative Zerstörung bei der Aufreinigung zu vermeiden: „*The physical properties of most of these compounds made purification difficult, and great care was required to prevent oxidation during manipulation or in syntheses.*”<sup>[17]</sup>

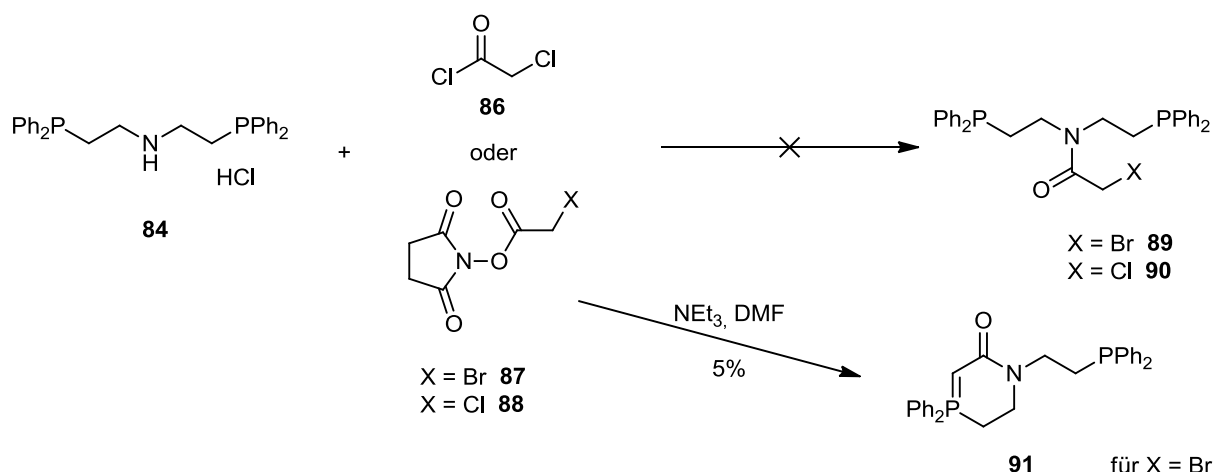


**Schema 27:** Synthese des Acrylamidphosphins **85**.

Es war nicht möglich ein Brom- oder Chloracetamid aus dem Phosphinamin **84** herzustellen. Die Amidbildung wurde mit Chloressigsäurechlorid (**86**) und den Essigsäureoxysuccinimiden **87** und **88** getestet. In der Reaktion mit Bromessigsäureoxysuccinimid (**87**) war es möglich ein entstandenes Nebenprodukt aufzureinigen und zu charakterisieren (Schema 28). Das Amid wurde erfolgreich gebildet, aber anschließend hat in dem gewünschten Produkt eine intramolekulare Reaktion zum Phosphorylen **91** durch einen nucleophilen Angriff eines Phosphins am Bromacetamid stattgefunden.

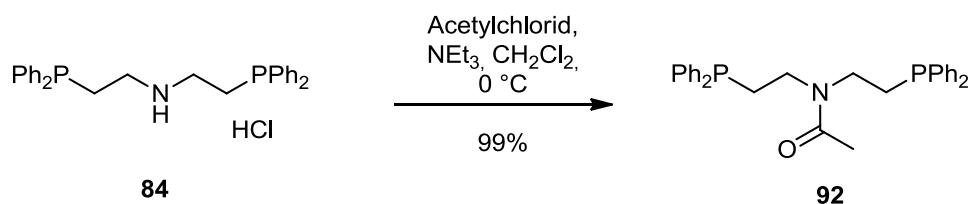


## Durchführung



**Schema 28:** Amidbindungsversuche mit funktionalisierten Essigsäurederivaten und charakterisiertem Nebenprodukt **91**.

Die Amidbildung mit dem unfunktionalisierten Essigsäurederivat Acetylchlorid war möglich (Schema 29).



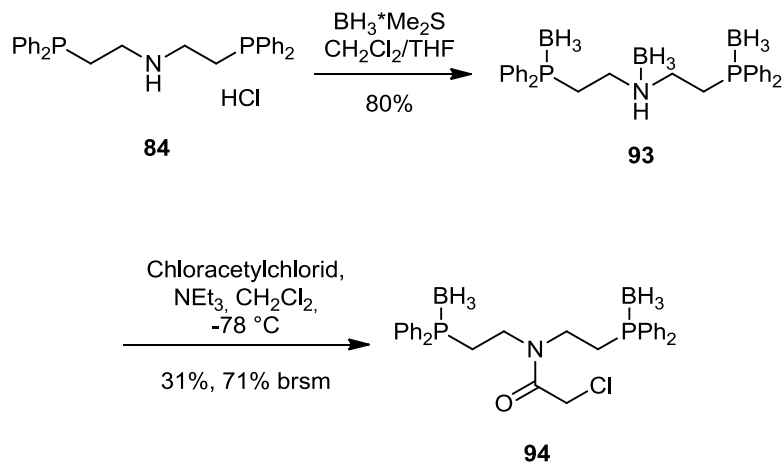
**Schema 29:** Synthese des Acetamidphosphins **92**.

Die geplanten Moleküle **2** und **3** konnten nicht synthetisiert werden, da sie nicht stabil sind. Die intramolekularen Reaktivitäten – Nucleophilie des Phosphors und Elektrophilie des Halogenacetamids – sind zu hoch und die Reaktion führt zur Bildung eines stabilen Sechsrings.

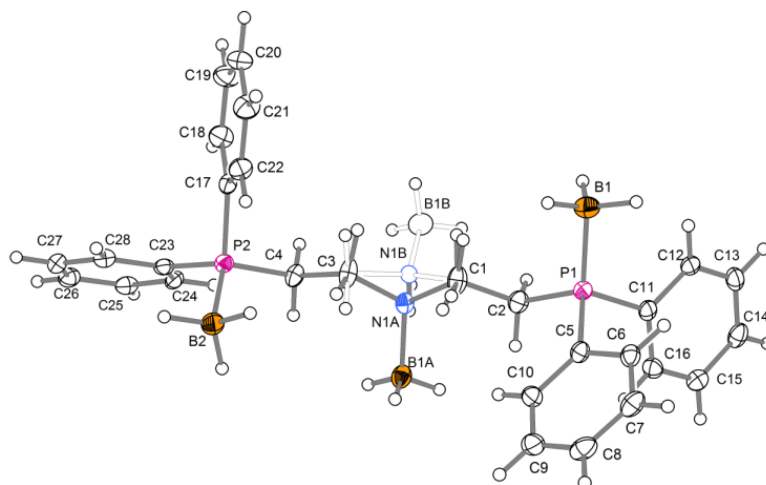
Die Elektrophilie des Halogenacetamids wird für die Reaktion mit dem Cystein im Protein benötigt, so dass sie nicht weiter herabgesetzt werden kann. Die Nucleophilie des Phosphors wird erst für die Komplexbildung benötigt und könnte bis zur Komplexbildung reversibel herabgesetzt werden. Um die Nucleophilie des Phosphors zu verringern, können Phosphine mit Boranen geschützt werden.<sup>[11,45]</sup> Eine solche Schützung muss vor der Amidbildung durchgeführt werden. Sobald die Chloracetamidgruppe mit dem Cystein im Protein reagiert hat, kann die Entschützung der Phosphine stattfinden. Die Entschützungsverfahren muss enzymkompatibel in der *hCA* II stattfinden können. Die Schützung der Phosphine verlief in guter Ausbeute (Schema 30). Bei der Umsetzung von **84** zu **93** kam es nicht nur zu der

## Durchführung

gewünschten Boran-Phosphin-, sondern auch zu einer Boran-Amin-Bindung. Dies konnte mithilfe einer Kristallstruktur nachgewiesen werden (Abb. 11). Die anschließende Amidbildung führte in akzeptablen Ausbeuten zum Chloracetamid **94**.

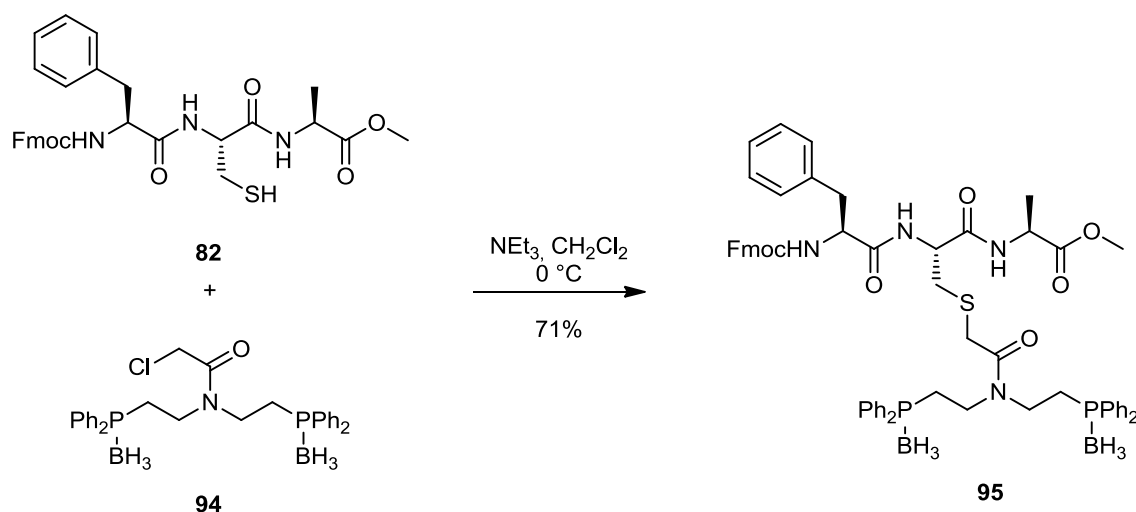


**Schema 30:** Boranschützung der Phosphine und anschließende Synthese des Chloracetamids **94**.



**Abb. 11:** Kristallstruktur des Boran-geschützten Phosphinamins **93**.

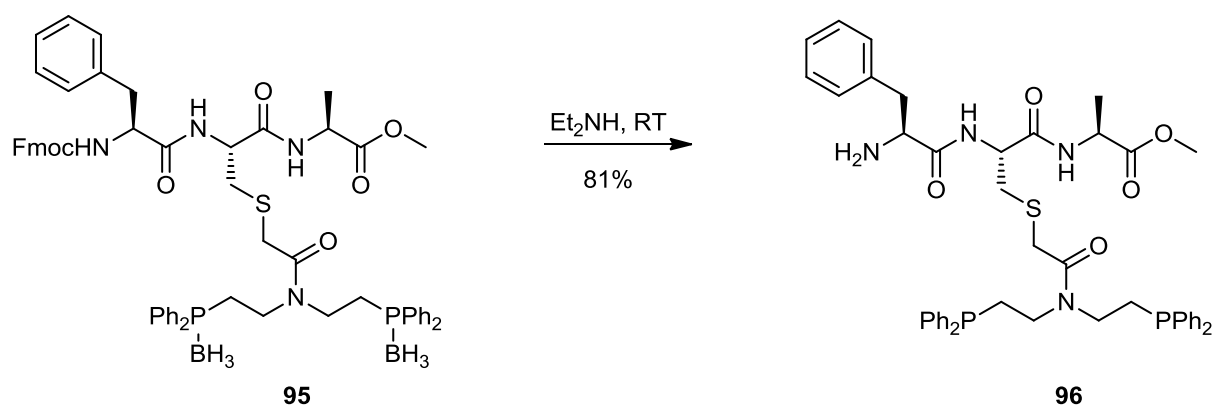
Mit dem Phosphinchloracetamid **94** und dem bereits synthetisiertem Tripeptid **82** konnte die Kupplungsreaktion getestet werden, welche in guter Ausbeute mit dem geschützten Peptid in Dichlormethan zum Peptidphosphin **95** führte (Schema 31).



**Schema 31:** Kupplung des Chloracetamids **94** an das Cystein des Tripeptids **82**.

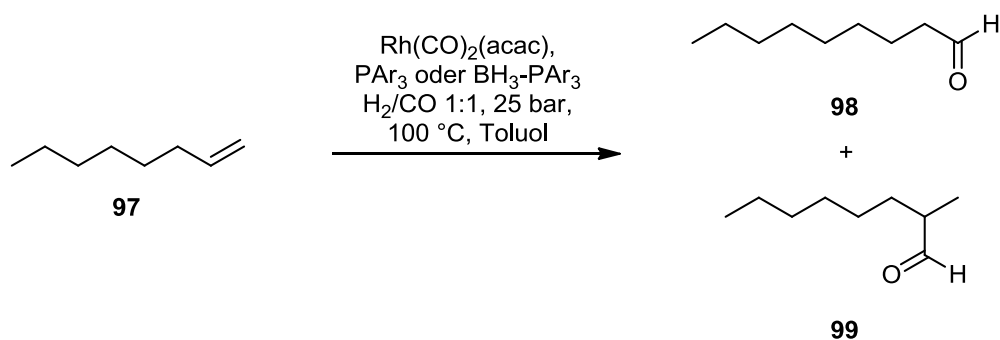
Nach der erfolgreichen Ligandensynthese und der ebenfalls erfolgreichen Kupplung an das Tripeptid **82** sollten die optimierten Bedingungen für die Anknüpfung der Dansylderivate **75** und **76** (Tabelle 4) an das Protein auf die Phosphinliganden übertragen werden. Die Kupplungsversuche erfolgten mit dem Chloracetamidphosphinboran **94** und dem Acrylamidphosphin **85**. In massenspektrometrische Analysen konnte in beiden Fällen allerdings nur unmodifiziertes Protein gefunden werden. Da die reaktiven Gruppen die gleichen wie bei den Dansylderivaten waren, könnte die ausbleibende Reaktion an der schlechten Löslichkeit der Liganden in Wasser oder an einer fehlenden Affinität zur aktiven Tasche der *hCA* II-H64C liegen.

Es ist derzeit noch keine enzymkompatible Entschützungsverfahren von borangeschützten Phosphinen in der Literatur bekannt. Aus diesem Grund sollten trotz der nicht erfolgreichen Kupplung an das Protein Entschützungsverfahren am Phosphinboranpeptid **95** untersucht werden. Kamer et al. schreiben in einem Übersichtsartikel<sup>[11]</sup>: „*Protected phosphines can be introduced [into proteins] however deprotection methods were found incompatible or ineffective for the obtained conjugates.*“ Zunächst wurde mit einer Standardmethode die Entschützung mit Diethylamin durchgeführt (Schema 32). Diese Methode ist nicht enzymkompatibel, aber die analytischen Daten des gewünschten Produktes konnten erhalten werden. In guten Ausbeuten wurde das entschützte Phosphin **96** erhalten.



**Schema 32:** Phosphin-Entschützung mit Diethylamin.

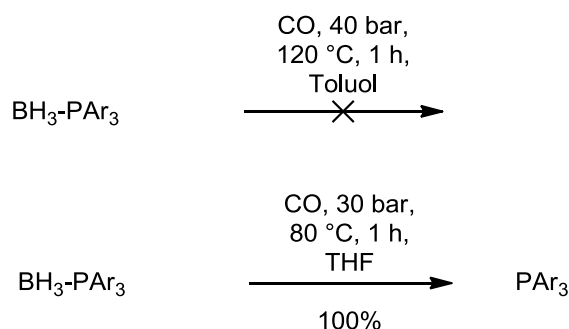
Williams et al.<sup>[45]</sup> berichten in einem 2011 veröffentlichten Artikel von Hydroformylierungsreaktionen, in denen sie borangeschützte Phosphine einsetzten. Diese wurden *in situ* unter Hydroformylierungsbedingungen und Zugabe eines zu koordinierenden Übergangsmetalls entschützt. Hierbei sollte durch Bildung eines Boran-CO-Komplexes das freie Phosphin entstehen, welches mit Rhodium oder Palladium den katalytisch aktiven Übergangsmetallkomplex bildet. Es wurden verschiedene Triarylphosphine synthetisiert. Zur Überprüfung der Methode wurden die borangeschützten und freien Phosphine unter gleichen Reaktionsbedingungen in einer Hydroformylierungsreaktion von 1-Octen eingesetzt (Schema 33).



**Schema 33:** Williams' Hydroformylierungsreaktion mit geschützten Phosphinen von 1-Octen.<sup>[45]</sup>

Die Ergebnisse der geschützten und ungeschützten Phosphine waren in Bezug auf Ausbeute, *Turnover* Frequenz, und dem Verhältnis von linearem zu verzweigtem Produkt sehr ähnlich. Um den Entschützungs-schritt, also die Bildung des freien Phosphins und die Bildung des Boran-CO-Komplexes, einzeln zu betrachten, wurden folgende Reaktionen durchgeführt (Schema 34):

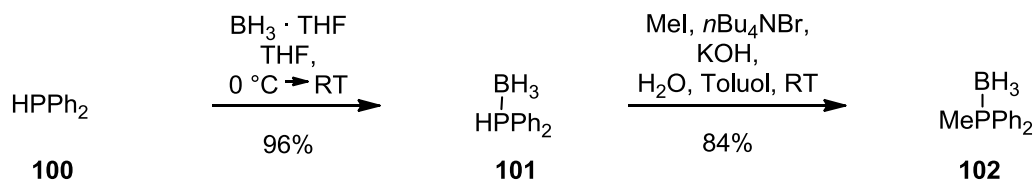
## Durchführung



**Schema 34:** Williams' Entschützungsversuche von Phosphin-Boran-Komplexen mit CO.<sup>[45]</sup>

Die Entschützungsreaktion von *Williams* war lösungsmittelabhängig. Ebenfalls konnte eine Druck- und Temperaturabhängigkeit beobachtet werden. In THF bei 1 bar CO und 25 °C fand die Reaktion zum freien Phosphin nicht statt. Allerdings wurde nicht mit weiteren Versuchen auf die Druck- und Temperaturabhängigkeit eingegangen und diese genauer untersucht.<sup>[45]</sup>

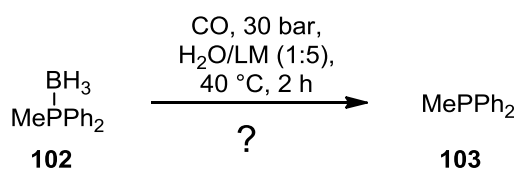
Diese Entschützungs-methode sollte auf das in dieser Arbeit hergestellte System übertragen werden und dabei auf Enzymkompatibilität getestet werden. Erste Entschützungsversuche am Phosphinboranpeptid **95** führten zu keiner Reaktion (unter 60 °C) oder zu unerwünschten Nebenreaktionen (60-100 °C). Als Lösungsmittel wurde THF gewählt und die Temperatur, der Druck (30 und 50 bar) und die Zugabe von Rhodium (0, 0.1 und 1.0 eq) variiert. Aufgrund des hohen synthetischen Aufwands das Phosphinboranpeptid **95** herzustellen, wurde ein Testsystem eingeführt. Dieses konnte in sehr guten Ausbeuten nach literaturbekannten Vorschriften<sup>[46,47]</sup> hergestellt werden (Schema 35). Zunächst wurde Diphenylphosphin (**100**) mit einem Boran-THF-Komplex zum geschützten Phosphin **101** umgesetzt.<sup>[46]</sup> Anschließend wurde unter Phasentransferbedingungen mit Methyljodid das geschützte Methyldiphenylphosphin **102** in sehr guten Ausbeuten erhalten.<sup>[47]</sup>



**Schema 35:** Synthese von Boran geschütztem Methyldiphenylphosphin **102**.

## Durchführung

Die Reaktionstemperatur wurde auf maximal 40 °C festgelegt, damit die Methode in modifizierten Enzymen funktioniert, ohne dass das Enzym denaturiert. Der Druck wurde auf 30 bar gesetzt. In folgenden Experimenten wurden verschiedene Wasser-Lösungsmittel-Gemische getestet (Schema 36, Tabelle 5). Das Wasser-Lösungsmittel-Gemisch wurde im Hinblick auf die Übertragung in eine wässrige Enzymlösung gewählt. Der Reaktionsverlauf wurde mit  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie verfolgt.

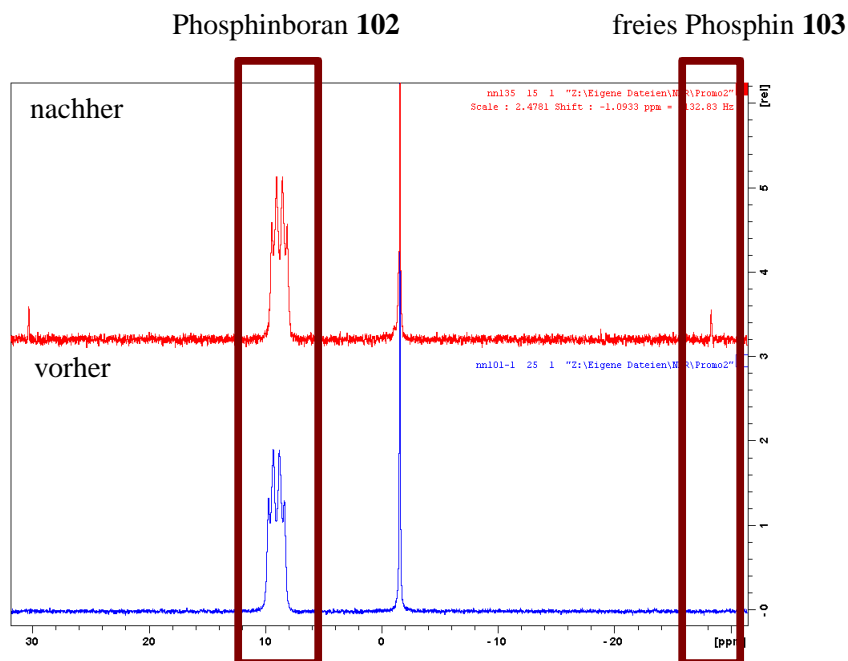


**Schema 36:** Reaktionsbedingungen für die Phosphin-Entschützungsversuche.

Lösungsmittel	Ergebnis
Tol/H <sub>2</sub> O	-
MeCN/H <sub>2</sub> O	-
MeOH/H <sub>2</sub> O	- (schlechte Löslichkeit)
THF	-
THF/H <sub>2</sub> O (pH = 7)	+
THF/H <sub>2</sub> O (pH = 4)	-
THF/H <sub>2</sub> O (pH = 10)	-

**Tabelle 5:** Ergebnisse der Entschätzung in verschiedenen Lösungsmitteln: – : keine Reaktion.

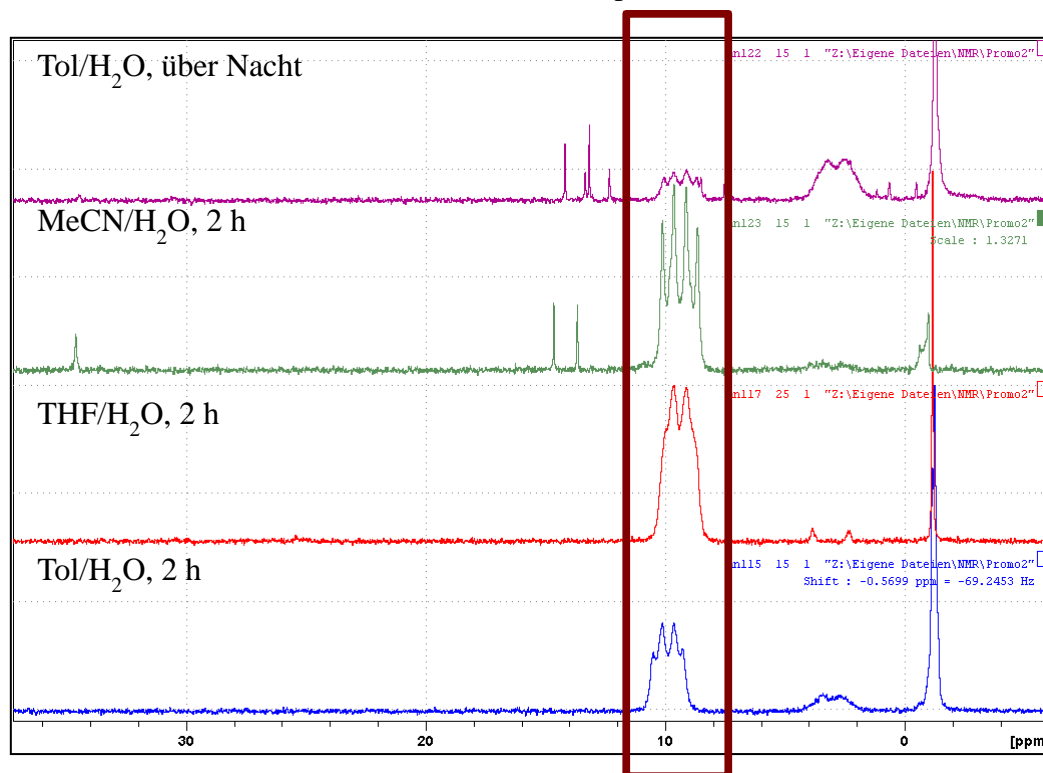
Das einzige Lösungsmittelgemisch, bei dem ein geringer Teil entschütztes Phosphin im  $^{31}\text{P}$ -NMR nachgewiesen werden konnte, war THF/H<sub>2</sub>O in den Verhältnissen 5:1 und 1:1 (Abb. 12). In allen anderen Lösungsmitteln fand keine Reaktion statt (Tabelle 5).



**Abb. 12:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren der Entschützungsreaktion: unten: Phosphinboran **102** (Edukt) vor der Reaktion; oben: Mischung aus Phosphinboran **102** und freiem Phosphin **103** nach der Reaktion in THF/Wasser.

Sowohl eine pH-Wert Änderung ins Basische (pH = 10) als auch ins Saure (pH = 4) führten zu keiner Produktbildung (Tabelle 5). Die Reaktion war pH-Wert abhängig und lief mit geringem Umsatz in neutralem Lösungsmittel ab. In darauffolgenden Optimierungsversuchen konnte der gewünschte Produktpeak im  $^{31}\text{P}$ -NMR nicht vergrößert werden, so dass diese Entschützungsroute aufgegeben wurde.

Die Reaktion wurde zusätzlich unter gleichen Bedingungen mit Zugabe von 1/8 eq  $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$  durchgeführt. Die in geringem Maße neu entstandenen Verbindungen (Abb. 13) konnten nicht charakterisiert werden und so wurde auch die Entschätzung unter gleichzeitiger Komplexbildung nicht weiter verfolgt.

Phosphinboran **102**

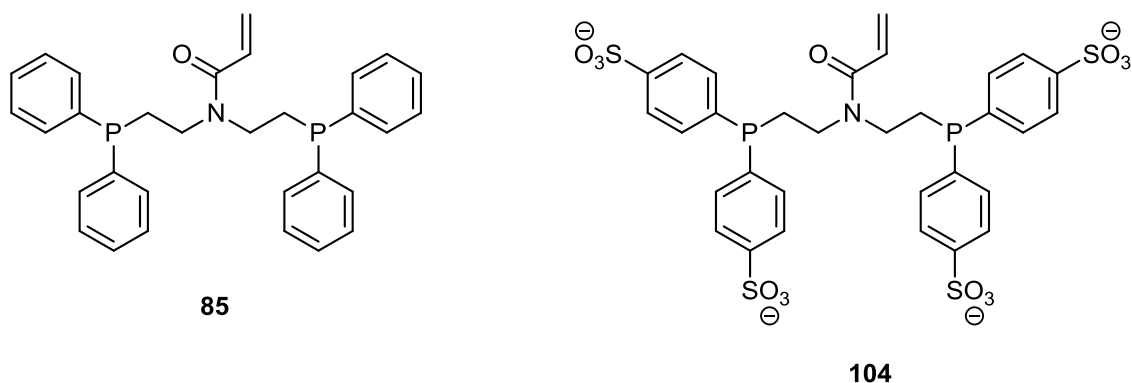
**Abb. 13:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von Entschützungsversuchen unter Zugabe von  $[\text{Rh}(\text{cod})\text{Cl}]_2$  in unterschiedlichen Lösungsmittelsystemen.

#### 4.6 Synthese eines wasserlöslichen Phosphins

Aufgrund der Anknüpfungsprobleme des borangeschützten Phosphins **94** an das Protein, die eventuell auf Löslichkeitsprobleme in Wasser zurückzuführen sind, sollte ein wasserlöslicher Phosphinligand entwickelt werden. Als reaktive Gruppe zur Reaktion mit dem Cystein wurde die Acrylamideinheit gewählt, welche im freien Phosphinliganden **84** eingeführt werden kann. Fügt man an dem Liganden **85** an jedem Aromaten in *para*-Position eine Sulfonatgruppe ein, sollte die so erhaltene Zielstruktur **104** wasserlöslich sein (Abb. 14).

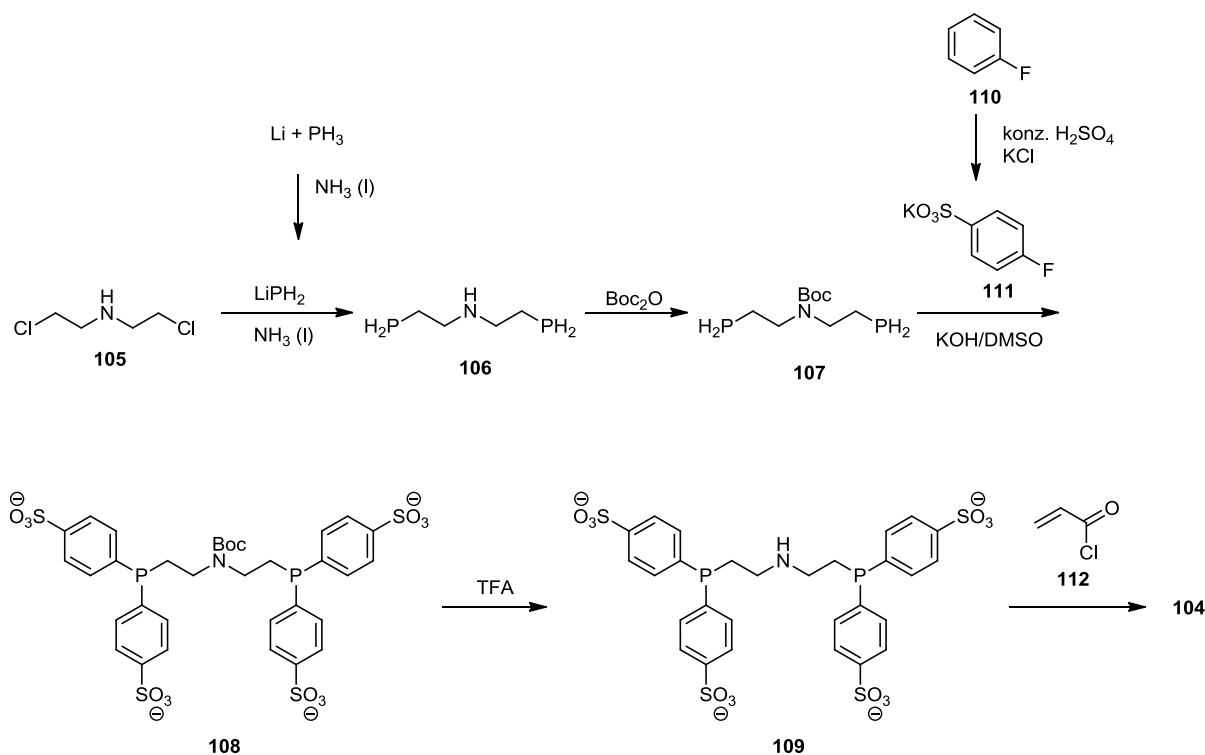


## Durchführung



**Abb. 14:** Whitesides' Phosphinligand **85** und der wasserlösliche Phosphinligand **104**.

In Schema 37 ist die geplante Syntheseroute gezeigt.



**Schema 37:** geplante Syntheseroute zum wasserlöslichen Phosphin **104**.

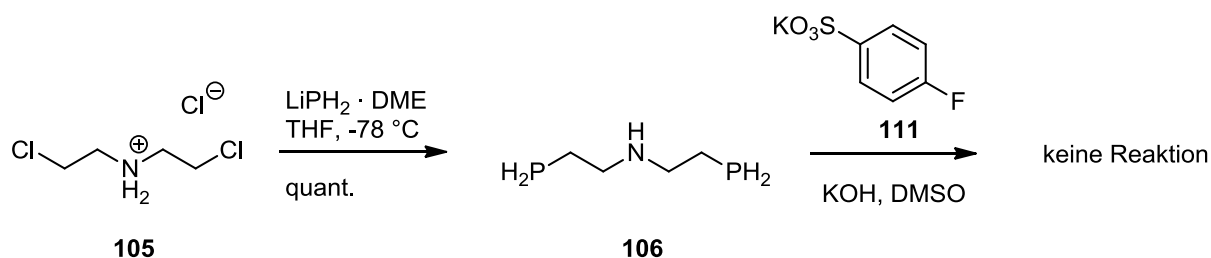
Beginnend mit einer Substitutionsreaktion von Lithiumphosphid am symmetrischen *N,N*-Bis-(2-chloroethyl)amin (**105**), soll am entstandenen Phosphin **106** das Amin geschützt werden. Eine folgende vierfache nucleophile aromatische Substitution mit Kalium *p*-Fluorobenzolsulfonat (**111**) soll die vier aromatischen Reste an den Phosphinen einführen um zum Phosphin **108** zu gelangen. Nach einer anschließenden Entschützung des Amins soll die Umsetzung mit Acrylsäurechlorid (**112**) zum gewünschten Acrylamid **104** führen.

## Durchführung

Diese kurze Syntheseroute wird durch den Einsatz von Lithiumphosphid möglich, welches aus elementarem Lithium und Phosphan in flüssigem Ammoniak hergestellt werden muss.<sup>[48]</sup>

Die Arbeitsgruppe von Prof. *von Hänisch* an der Universität Marburg stellte mir Lithiumphosphid zur Verfügung. Das Kalium *p*-Fluorbenzolsulfonat (**111**) konnte nach Literaturvorschrift in einer Sulfonierungsreaktion aus Fluorbenzol (**110**) hergestellt werden.<sup>[49]</sup>

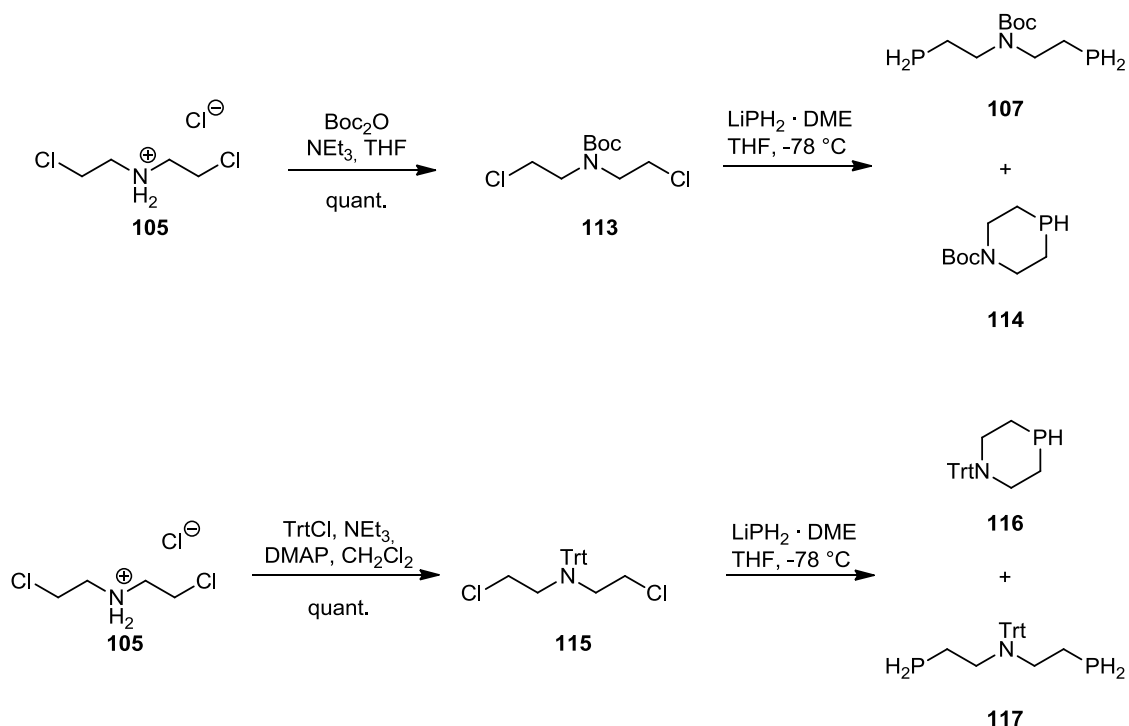
Die erste Reaktion konnte mittels <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie verfolgt werden. Aufgrund der Reaktivität des Phosphins **106** ist die Ausbeute nur durch <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie bestimmt worden. Das saubere Rohprodukt wurde nicht geschützt, sondern direkt mit Kalium *p*-Fluorbenzolsulfonat in einer nukleophilen aromatischen Substitutionsreaktion umgesetzt. Die literaturbekannten Bedingungen<sup>[50]</sup> für ähnliche Systeme führten zu keiner Umsetzung (Schema 38).



**Schema 38:** Synthese des Phosphins **106**.

Durch die hohe Sauerstoffempfindlichkeit des Phosphins **106** konnte die Schützung des Amins an dieser Stelle nicht durchgeführt werden. Es sollte auf einer zweiten Route die Schützung des Amins vor der Einführung des Phosphins getestet werden. Die Boc- und Trityl-Gruppe wurden als Schutzgruppen ausgewählt. Die Schützungen verliefen in quantitativer Ausbeute (Schema 39). In beiden Fällen konnte das Phosphin eingeführt werden, allerdings entstanden zusätzlich zu den gewünschten Produkten **107** und **117** die ringförmigen Nebenprodukten **114** und **116**. Auf dieser Stufe konnte wegen der Oxidationsempfindlichkeit der Produkte keine Aufreinigung durchgeführt werden. Diese Route wurde daraufhin nicht weiterverfolgt.

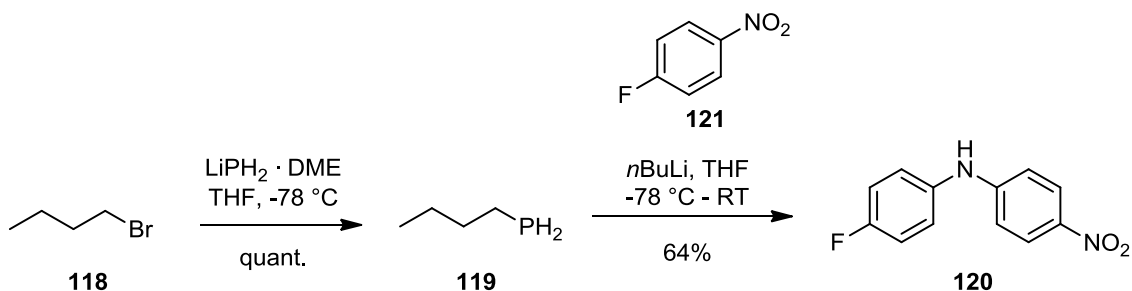
## Durchführung



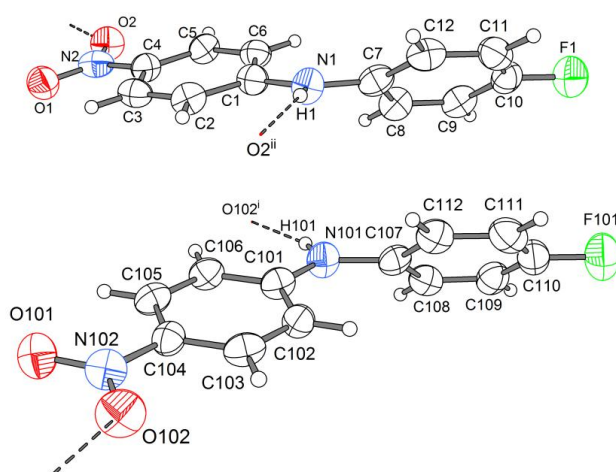
**Schema 39:** Beginn der zweiten Syntheseroute: Aminschtzung und Phosphineinführung.

Für Untersuchungen der nukleophilen aromatischen Substitution eines Phosphins an Kalium *p*-Fluorbenzolsulfonat wurde ein Testsystem eingeführt, bei dem die Substitutionsreaktion nur zweimal und nicht wie im Originalsystem vier Mal pro Molekül an einem Alkylphosphin ablaufen muss. Um Löslichkeitsprobleme während der Reaktion auszuschließen, wurde als elektronenarmer Fluoraromat *p*-Fluornitrobenzol (**121**) genutzt. Als Edukt wurde Butylbromid (**118**) gewählt, welches unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie das Originalsystem quantitativ zum Phosphin **119** umgesetzt wurde (Schema 40). In der anschließenden Substitutionsreaktion wurde die Base variiert ( $\text{NaHMDS}$ ,  $\text{LDA}$ ,  $n\text{BuLi}$ ), wobei das Edukt im  $^{31}\text{P}$ -NMR verschwand, es aber nicht zum gewünschten Produkt reagierte. Ohne Base fand keine Reaktion statt. Das entstandene Produkt **120**, ein über ein Amin verbundenes Diarylsystem, konnte isoliert, charakterisiert und die Struktur röntgenkristallographisch nachgewiesen werden (Abb. 15).

## Durchführung

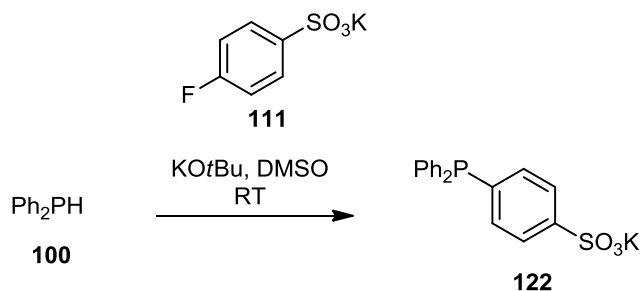


**Schema 40:** Synthese des Testsystems **119** und Weiterreaktion zu **120**.



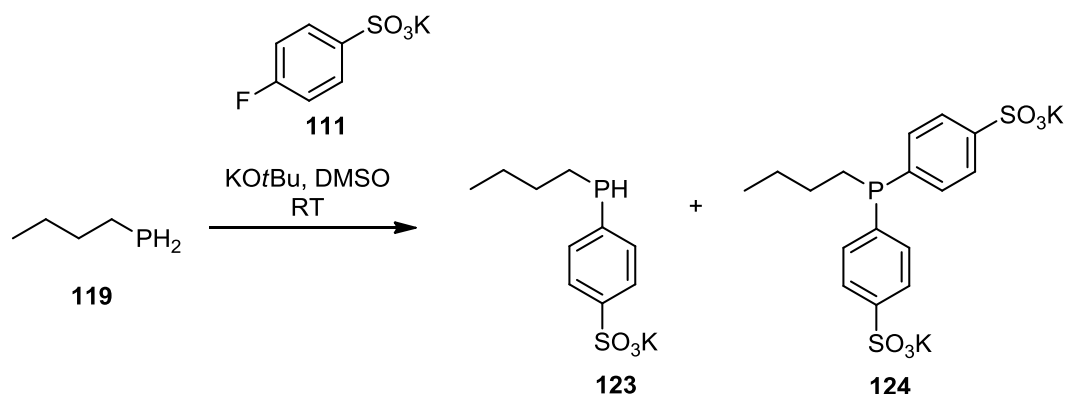
**Abb. 15:** Kristallstruktur von **120**.

Nitroaromat **121** wurde als Testsystem aufgegeben. Als Aromat wurde wieder Kalium *p*-Fluorbenzolsulfonat verwendet und als Phosphin wurde mit Diphenylphosphin (**100**) ein noch einfacheres Diarylphosphin für weitere Testreaktionen ausgewählt. An diesem System muss die Substitutionsreaktion nur einmal ablaufen, um zum gewünschten Produkt **122** zu gelangen. Es wurden verschiedene Basen (KOH und KO*t*Bu) in Kombination mit polar aprotischen Lösungsmitteln (DMSO, DMF und DMA) getestet. Die Reaktion fand nur in DMSO mit KO*t*Bu als Base statt (Schema 41).



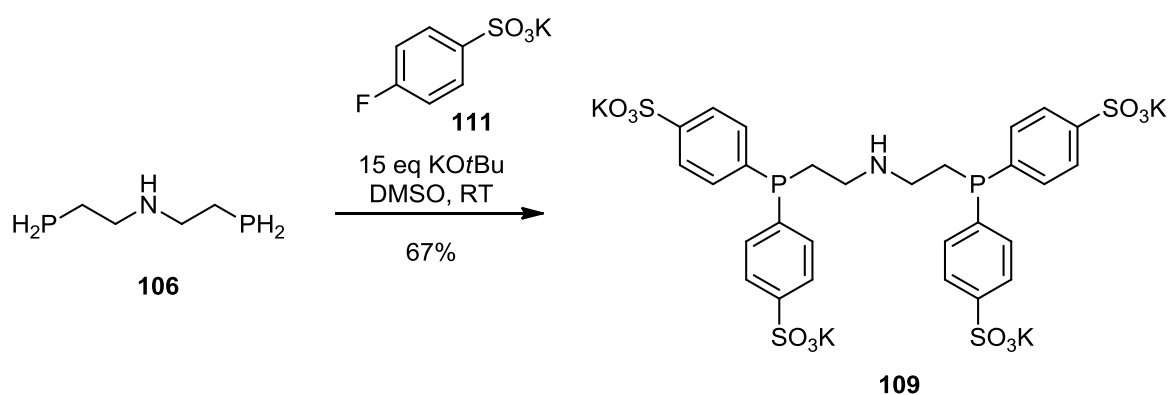
**Schema 41:** Nukleophile aromatische Substitution von Diphenylphosphin (**100**) an Kalium *p*-Fluorbenzolsulfonat (**111**).

Die Reaktionsbedingungen wurden zunächst auf Butylphosphin (**119**) übertragen, an dem die aromatische Substitutionsreaktion zwei Mal pro Molekül ablaufen muss. Die Reaktion führte in schlechter Ausbeute zu einer Mischung aus Monoarylphosphin **123** und Diarylphosphin **124** (Schema 42).



**Schema 42:** Nukleophile aromatische Substitution vom Alkylphosphin **119**.

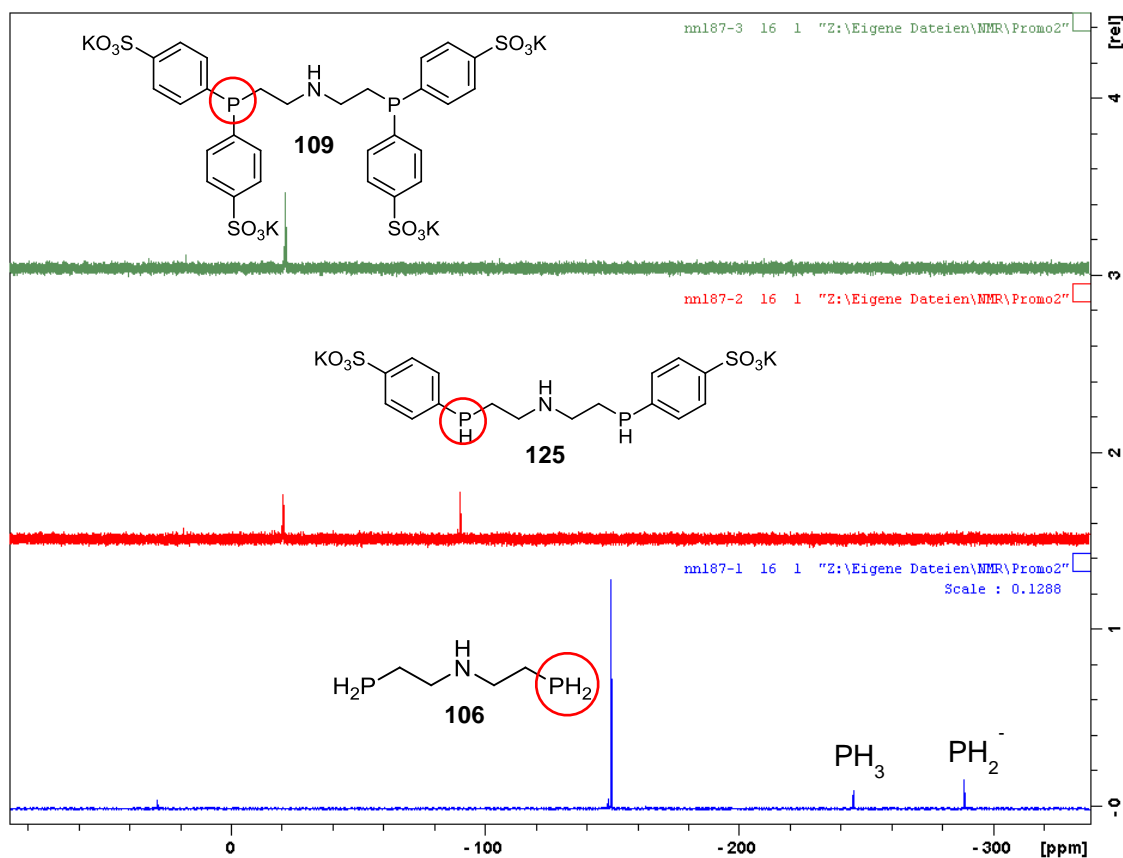
Anschließend wurden die Reaktionsbedingungen auf das Originalsystem **106** übertragen, in dem die Substitutionsreaktion vier Mal pro Molekül ablaufen muss. Nach weiteren Optimierungen der Bedingungen konnte das Bis-Diarylphosphin **109** in 67% Ausbeute erhalten werden (Schema 43). Es war mit Kaliumfluorid verunreinigt, welches nicht abgetrennt werden konnte, aber bei folgenden Reaktionen nicht störte.



**Schema 43:** Synthese des Bis-Diarylphosphins **109**.

## Durchführung

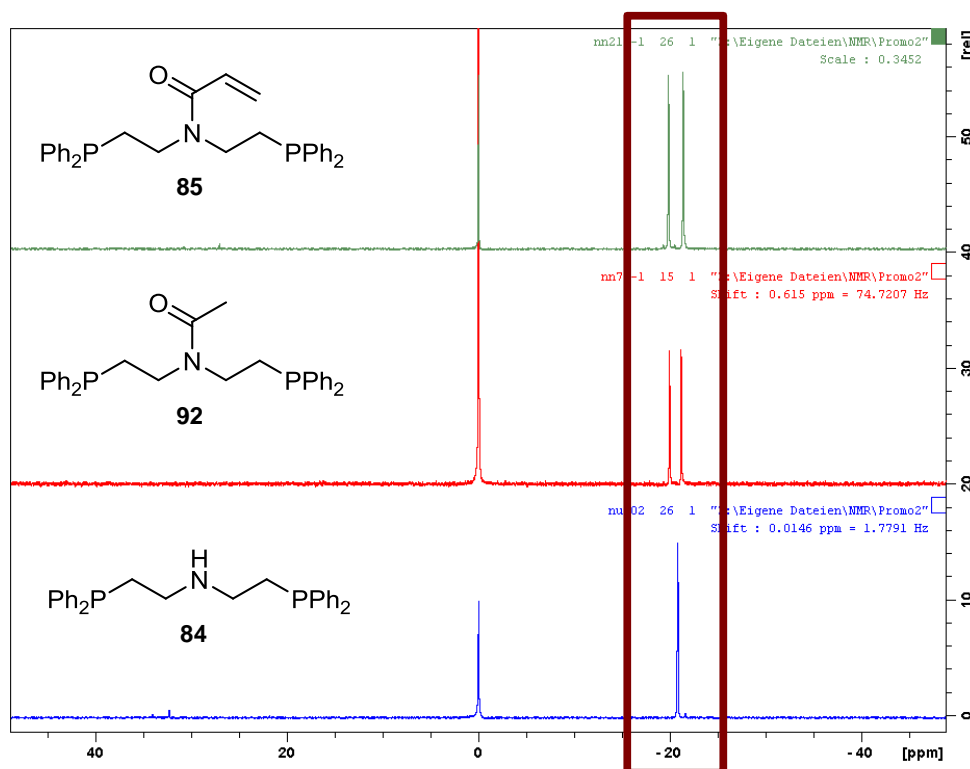
Die Reaktion kann spektroskopisch im  $^{31}\text{P}$ -NMR sehr gut verfolgt werden (Abb. 16).



**Abb. 16.:** Verfolgung der nukleophilen aromatischen Substitution mit  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie. Die Signale sind den rot markierten Phosphoratomen zuzuordnen.

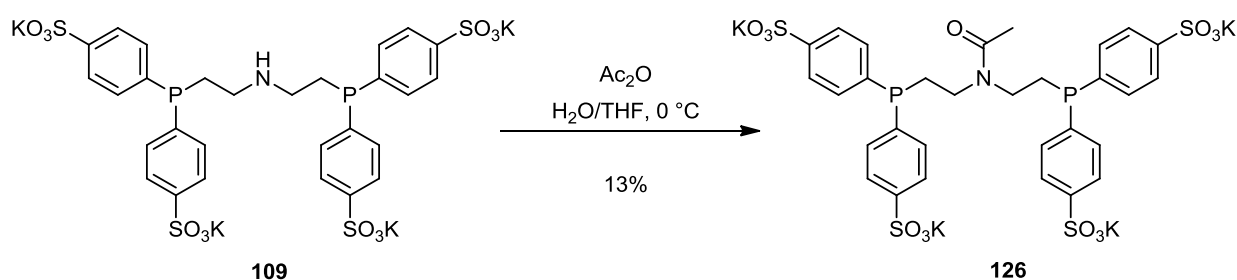
Die Amidbildung kann ebenfalls im  $^{31}\text{P}$ -NMR verfolgt werden. Das Signal verschiebt sich nicht, aber es wird durch die Amidbindung, die zu einer eingeschränkten Beweglichkeit führt, in zwei einzelne Signale aufgespalten. Dieses Phänomen hat schon Whitesides beobachtet<sup>[17]</sup>: „The  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra of the free ligands are usually characterized by two lines centered at  $\sim 1.5$  ppm. Control experiment demonstrated that the splitting occurs on acylation.“

Diese Aufspaltung der zwei Phosphorsignale konnte bei den in dieser Arbeit bereits synthetisierten Amiden beobachtet werden. Zwei Beispielspektren von den Amiden **85** und **92** und ein Spektrum vom Amin **84** sind in Abb. 17 gezeigt.



**Abb. 17:** Aufspaltung des Phosphorsignals durch Amidbildung. Der rote Rahmen kennzeichnet den relevanten Bereich im Spektrum.

Das synthetisierte Bisdiarylphosphin **109**, welches als Kaliumsalz eines Tetraanions vorliegt, ist nur noch in Wasser löslich. Erste Amidbildungsversuche in Wasser/THF-Gemischen mit Essigsäureanhydrid verliefen mit geringer Ausbeute erfolgreich (Schema 44).

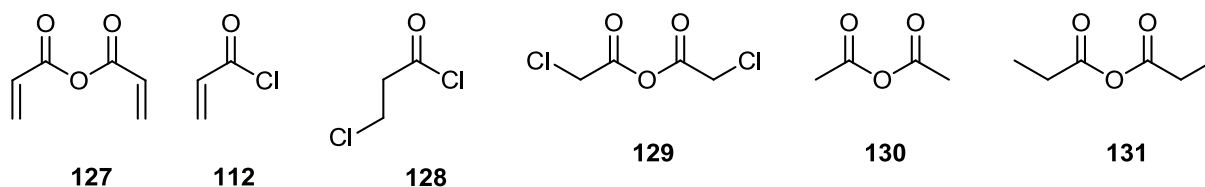


**Schema 44:** Amidbildung mit Essigsäureanhydrid.

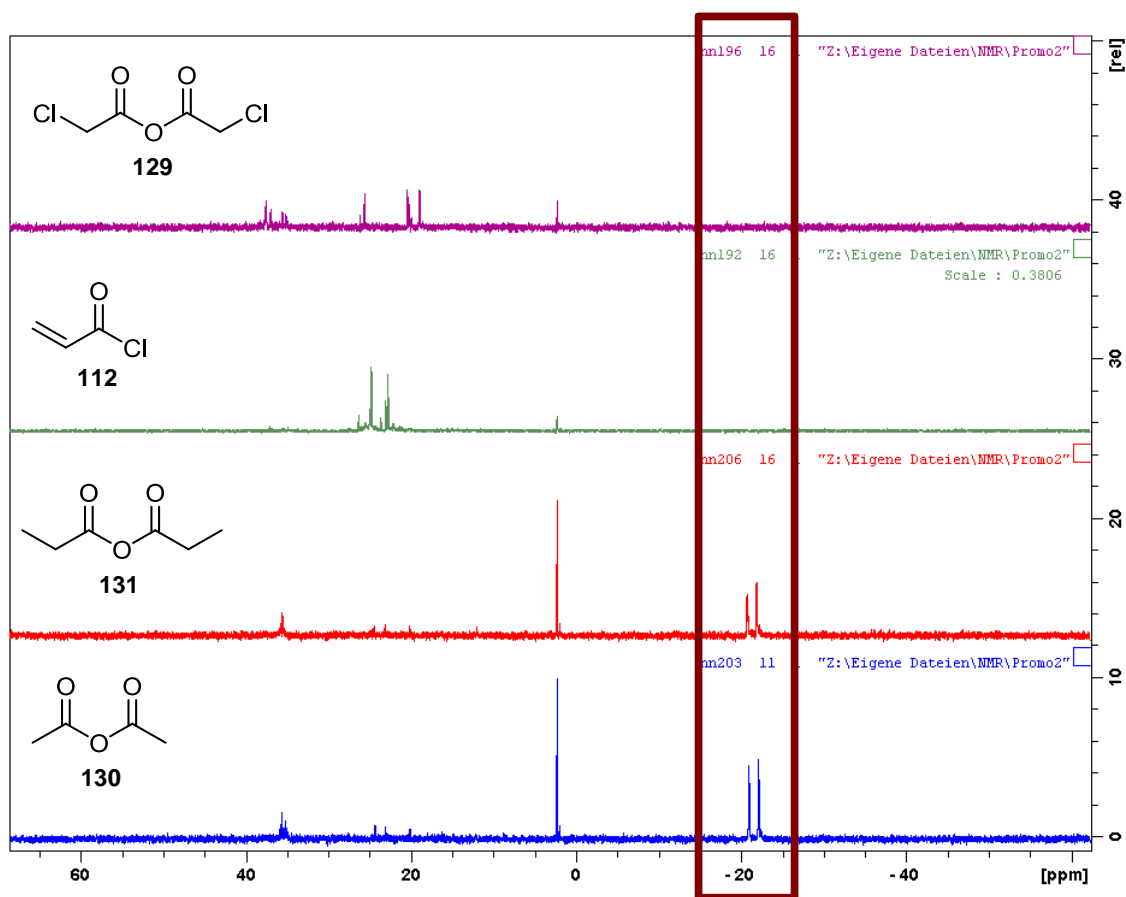
Anschließend wurden die in Abb. 18 abgebildeten Säurederivate unter gleichen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Die Amide konnten nur mit den unfunktionalisierten Anhydriden **130** und **131** gebildet werden. Die funktionalisierten Anhydride und Säurechloride reagierten in unerwünschten Nebenreaktionen ab. Die <sup>31</sup>P-NMR-Spektren in Abb. 19 zeigen bei Essigsäureanhydrid und Propionsäureanhydrid die charakteristischen zwei Signale im roten Kasten. In den beiden oberen Spektren ist kein Signal im Bereich

## Durchführung

um -20 ppm zu sehen. Der Phosphor liegt nicht mehr als Phosphin vor. Er hat mit den Säurederivaten **112** und **129** reagiert. Die entstandenen Nebenreaktionsprodukte wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht charakterisiert. Auch Kupplungsbedingungen führten mit Acrylsäure nicht zum gewünschten Amid.



**Abb. 18:** Säurederivate für die Amidbildung mit Bisdiarylphosphin **109**.

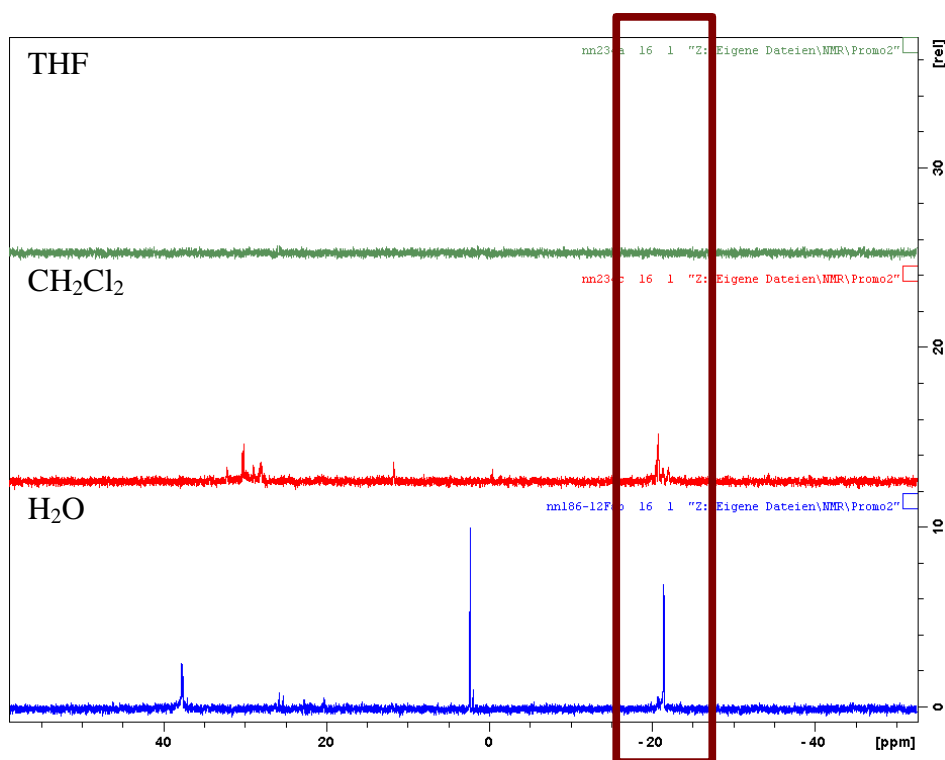


**Abb. 19:** <sup>31</sup>P-NMR-Spektren nach der Umsetzung von Bisdiarylphosphin **109** mit den Säurederivaten **129**, **112**, **131** und **130**.

Es ist schwierig zu verstehen, dass das Acrylamid an dem wasserlöslichen Bisdiarylphosphinsystem **109** nicht gebildet werden kann. Die Reaktion des Bis-Diphenylphosphin **84** mit Acrylsäurechlorid (**112**) führt zum gewünschten Produkt



(Schema 45). Durch die elektronenziehenden Sulfonatgruppen in *p*-Position an den Phenylresten wird der Phosphor elektronenärmer. Dadurch nimmt auch seine Nukleophilie ab. Die geringere Nucleophilie sollte zu einer geringeren Tendenz intramolekularer Reaktionen bzw. Nebenreaktionen des Phosphors führen und eine höhere Produktstabilität erwarten lassen. Einen großen Einfluss auf Reaktivität und Stabilität kann das Lösungsmittelsystem haben. Die zu vergleichenden Reaktionen werden in sehr unterschiedlichen Lösungsmittelsystemen durchgeführt. Die funktionierende Reaktion von Bis-Diphenylphosphin **84** mit Acrylsäurechlorid (**112**) findet in Dichlormethan statt und die Reaktion des Bisdiarylphosphins **109** wurde in Wasser getestet. Der Einfluss des Lösungsmittels sollte untersucht werden und die Reaktion des Bisdiarylphosphins **109** mit Acrylsäurechlorid (**112**) in ein organisches Lösungsmittel übertragen werden. Wie ist es möglich ein Kaliumsalz in ein organisches Lösungsmittel zu bekommen? Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Löslichkeit von **109** in org. Lösungsmitteln könnte die Komplexbildung des Kations mit einem organisch löslichen Komplexbildner sein. Hier bieten sich Kronenether oder Kryptanden an und speziell für Kalium 18-Krone-6 und Kryptofix[2.2.2].

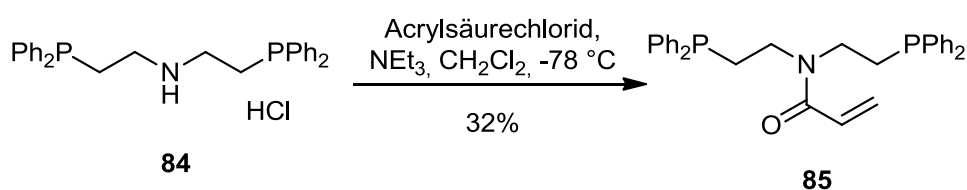


**Abb. 20:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren des Löslichkeitstests von Bisdiarylphosphin **109** mit Kryptofix[2.2.2] in THF (oben) und Dichlormethan (Mitte); unten: wässrige Lösung von **109** ohne Komplexbildner.

## Durchführung

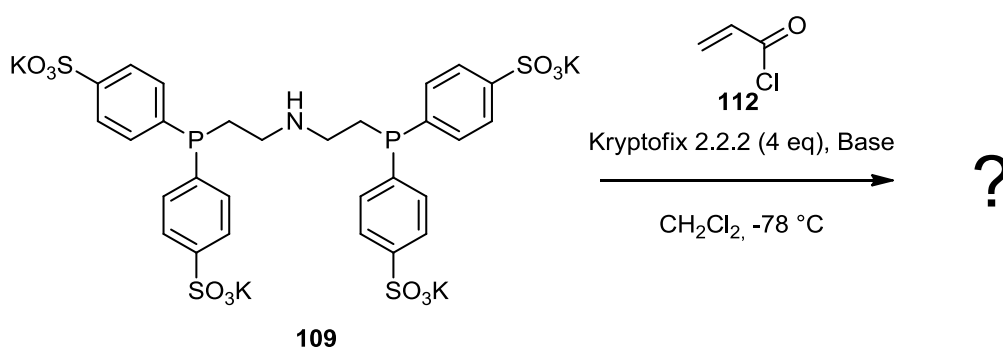
Das wasserlösliche Phosphin **109** wurde mit dem Kronenether bzw. dem Kryptanden in THF bzw. Dichlormethan gemischt und gerührt. Mit einer  $^{31}\text{P}$ -NMR-Messung konnte geprüft werden, ob sich das gewünschte Phosphin in Lösung befindet. In THF ist kein Signal im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum zu sehen. In Dichlormethan findet man das gewünschte Phosphin-Signal bei -20 ppm wieder (Abb. 20).

Es ist möglich mithilfe eines Kryptanden oder einem Kronenether das Lösungsmittelsystem von Wasser auf Dichlormethan umzustellen. Mit Dichlormethan ist das gleiche Lösungsmittel erreicht, welches in der bekannten und erfolgreich durchgeführten Reaktion des Bis-Diphenylphosphins **84** zum Acrylamid **85** verwendet wird (Schema 45).



**Schema 45:** Acrylamidbildung am Bis-Diphenylphosphin **84**.

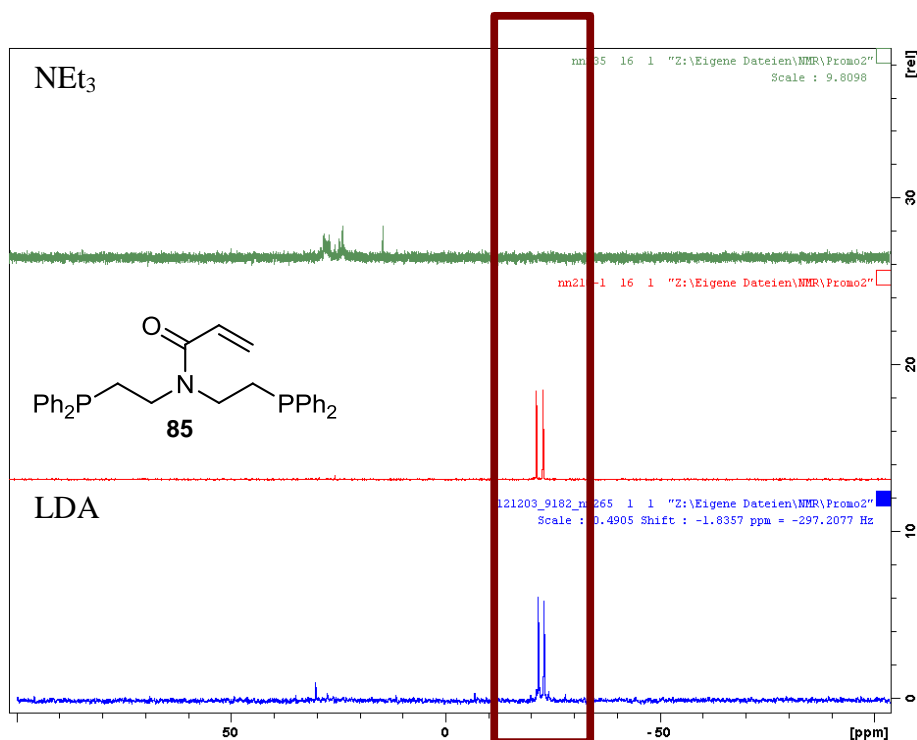
Können diese Reaktionsbedingungen erfolgreich übertragen werden (Schema 46)?



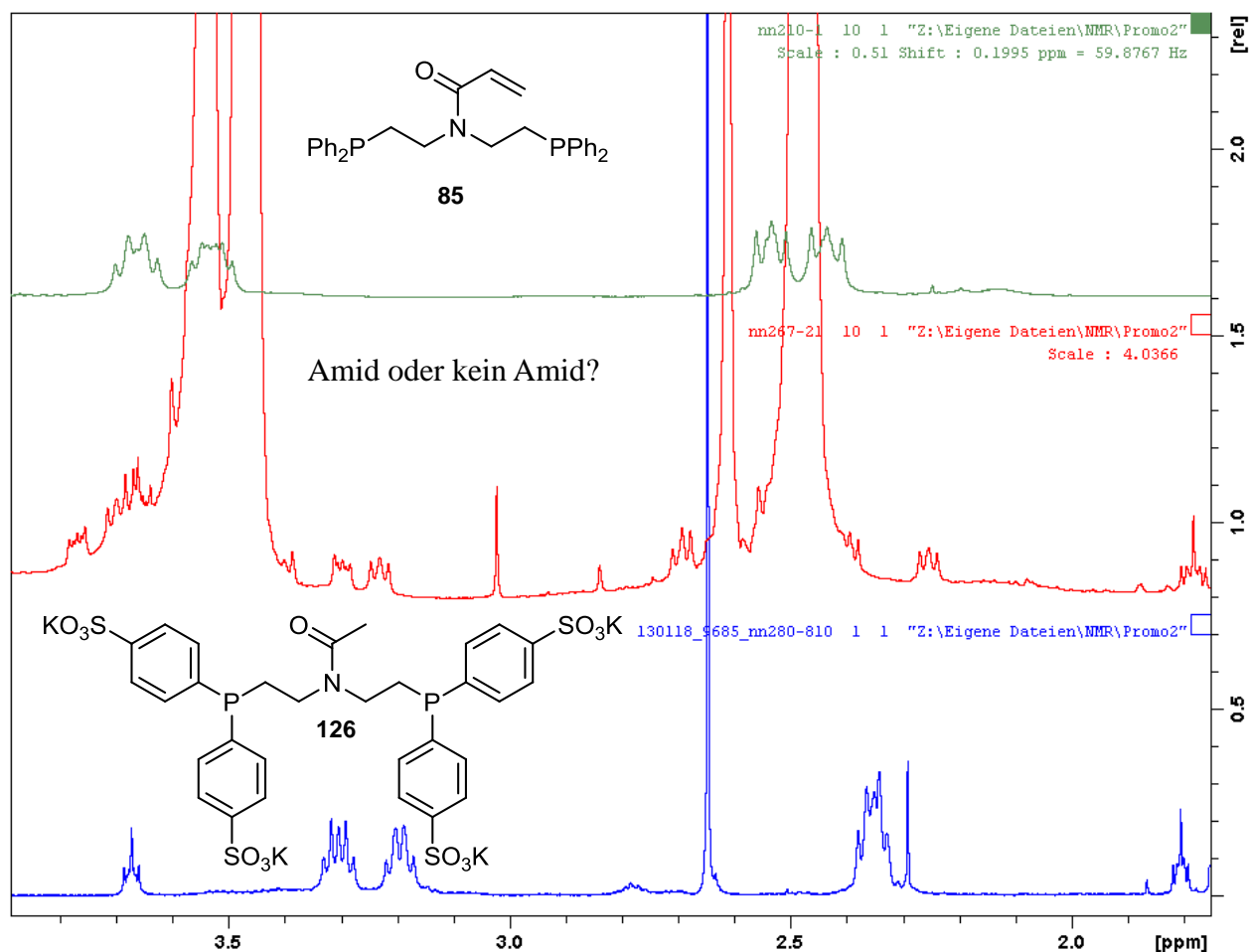
**Schema 46:** Reaktionsbedingungen zur Acrylamidbildung von Bisdarylphosphin **109** mit Acrylsäurechlorid (**112**) und verschiedenen Basen.

## Durchführung

Unter den bekannten Reaktionsbedingungen in Dichlormethan wurde mit dem wasserlöslichen Bis-Diarylphosphin **109** das Acrylamid nicht gebildet (Abb. 21). Wenn mit LDA eine stärkere Base eingesetzt wird, sieht das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum mit zwei Signalen bei -20 ppm nach einer erfolgreichen Amidbildung aus (Abb. 21). Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum überlagern die Signale des Kryptanden die relevanten alkyliischen Bereiche (Abb. 22). Ohne Aufreinigungsschritt kann keine Aussage über die Produkte der Reaktion gemacht werden.

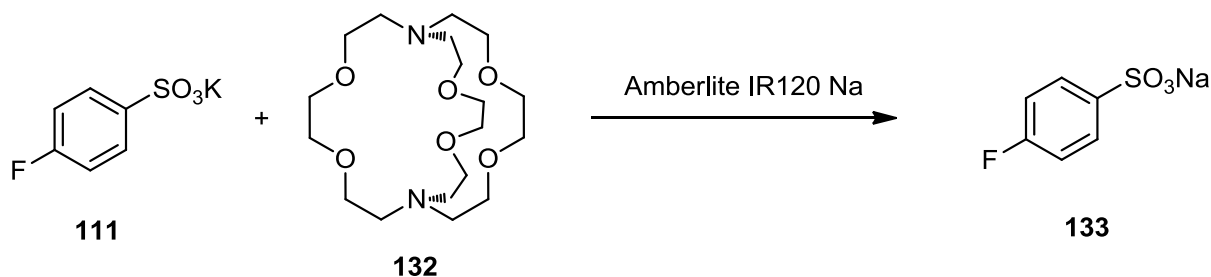


**Abb. 21:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren vom Bisdiphenylphosphinacrylamid **85** (Mitte) und den Reaktionen des Bisdiarylphosphin **109** mit Kryptand in Dichlormethan und verschiedenen Basen: oben:  $\text{NEt}_3$ ; unten: LDA; im roten Kasten ist der relevante Bereich des Phosphins ausgewählt.



**Abb. 22:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren: oben: Spektrum des Bisdiphenylphosphinacrylamids **85**; Mitte: Rohspektrum der Reaktion des Bisdiarylphosphins **109** mit Acrylsäurechlorid (**112**) in Dichlormethan mit LDA (Schema 46); unten: Spektrum des Bisdiarylphosphinacetamids **126**.

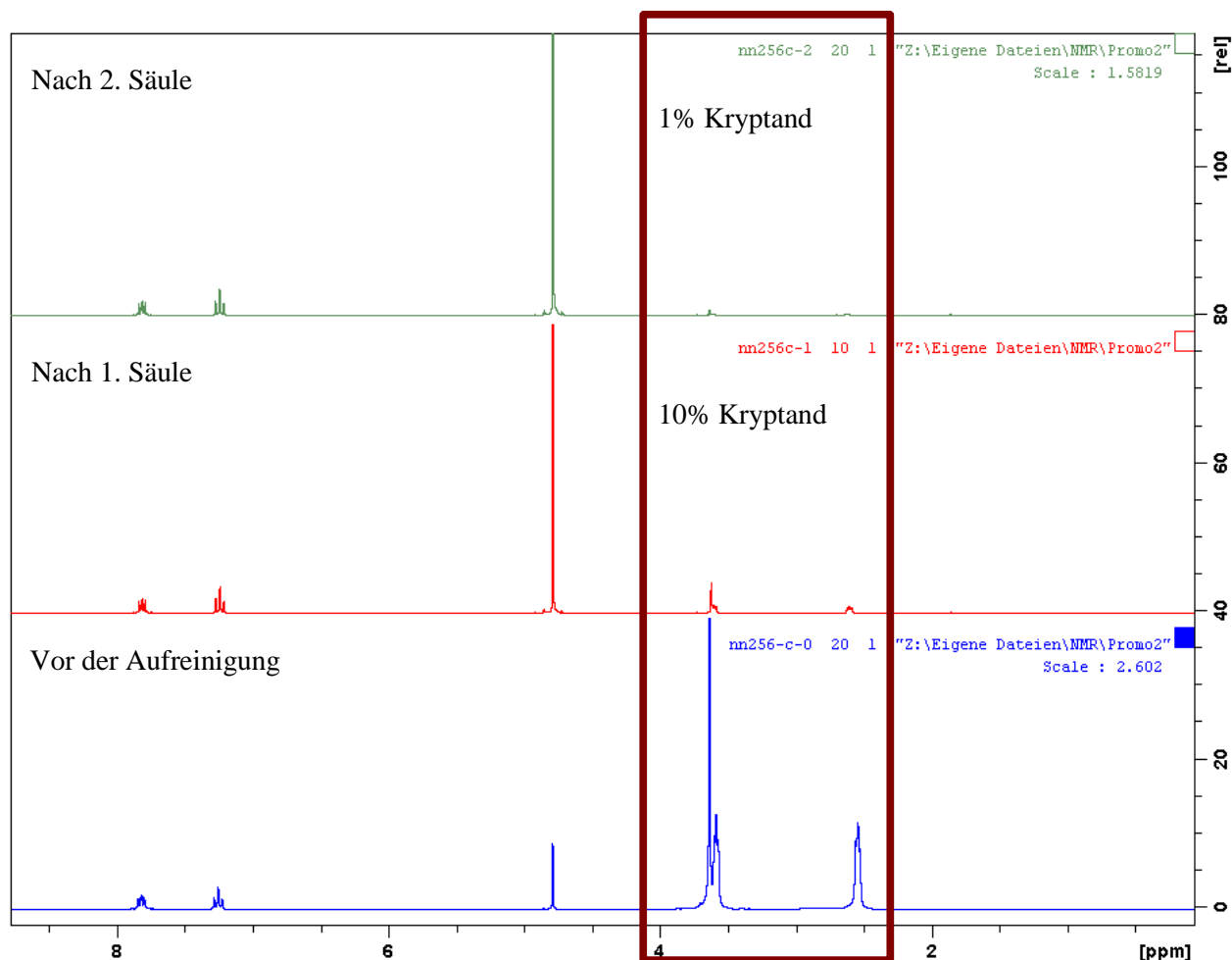
Zur Abtrennung des Kryptanden sollte eine Säule mit einem Ionenaustauscher eingesetzt werden. Der Ionenaustauscher sollte mit Natriumionen beladen sein und die komplexierten Kaliumionen durch Natriumionen ersetzen. Diese Abtrennung wurde zunächst an folgendem Testsystem durchgeführt (Schema 47).



**Schema 47:** Testsystem zur Abtrennung des Kalium-Kryptanden Komplexes.

## Durchführung

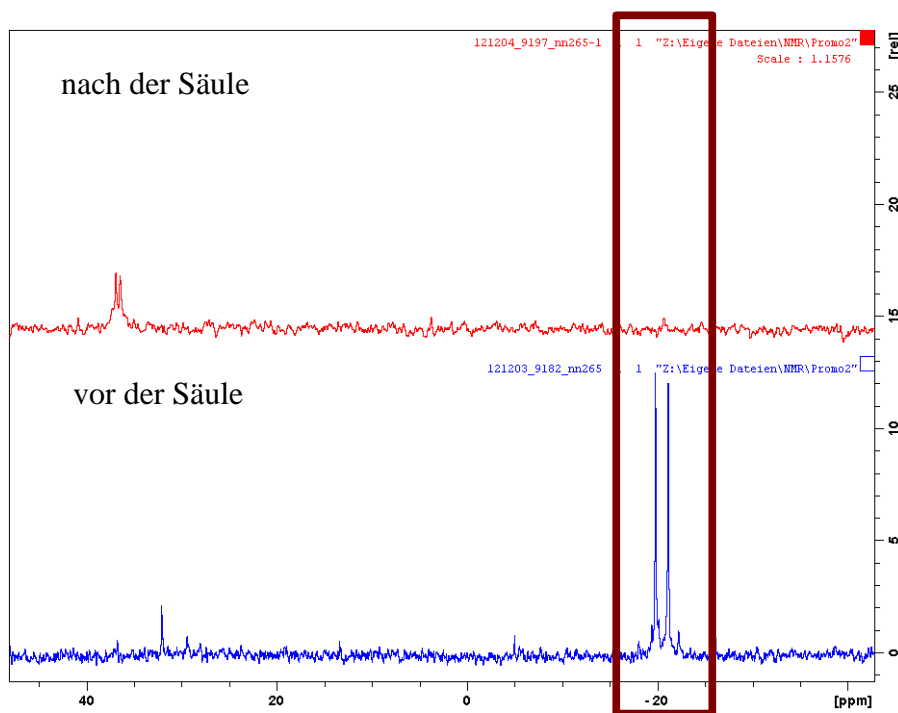
Der Ionenaustauscher wurde in eine Säule gefüllt und mit Natriumchloridlösung (50 g/250 mL) aufgeladen. Die Reaktionslösung wurde aufgetragen und mit Wasser eluiert. Mithilfe von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie konnte der Gehalt des Kryptanden bestimmt werden (Abb. 23). Der Kryptandenanteil nahm pro Säulendurchgang um 90% ab.



**Abb. 23:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Kryptandenabtrennung mit Ionenaustauschchromatographie.

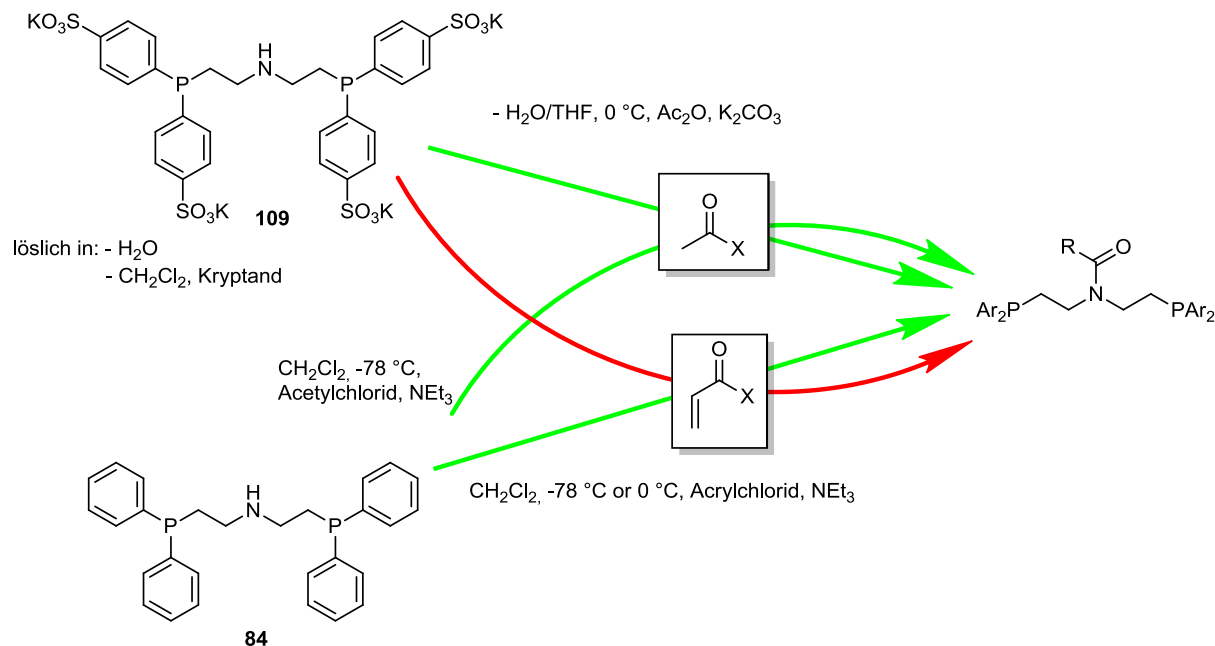
Es ist möglich den Kalium-Kryptanden-Komplex mittels Ionenaustauscher säulenchromatographisch abzutrennen. Diese Methode wurde auf das Originalsystem übertragen. Es war jedoch nicht möglich trotz Schutzgasatmosphäre und entgasten Wassers das erwünschte Phosphin **104** zu erhalten (Abb. 24).

## Durchführung



**Abb. 24:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren von der Aufreinigung der Amidbildungsreaktion von **109** mit LDA als Base (Schema 46).

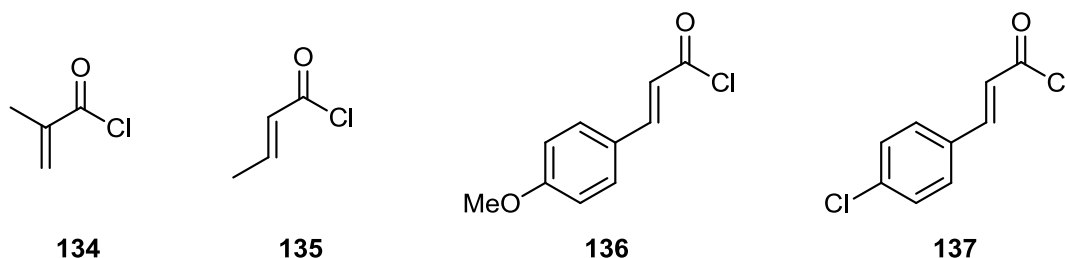
In folgendem Schema 48 sind die Amidbildungsbedingungen zusammengefasst.



**Schema 48:** Zusammenfassung der Amidbildungsreaktionen.

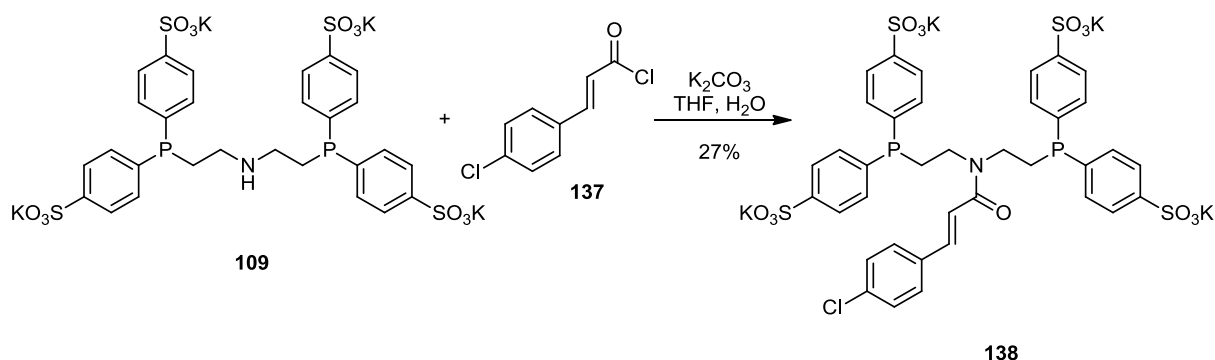
Ob es möglich war, das wasserlösliche Acrylamid **104** herzustellen und ob sich während der Aufreinigung dieses Produkt zersetzt hat oder ob es nicht synthetisiert werden konnten, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht klären.

Abschließend sollten die folgenden vier substituierten Acrylsäurechloride (Abb. 25) zur Amidbildung unter den wässrigen Reaktionsbedingungen eingesetzt werden, die mit Essigsäureanhydrid bereits erfolgreich zum Amid führten (Schema 44).

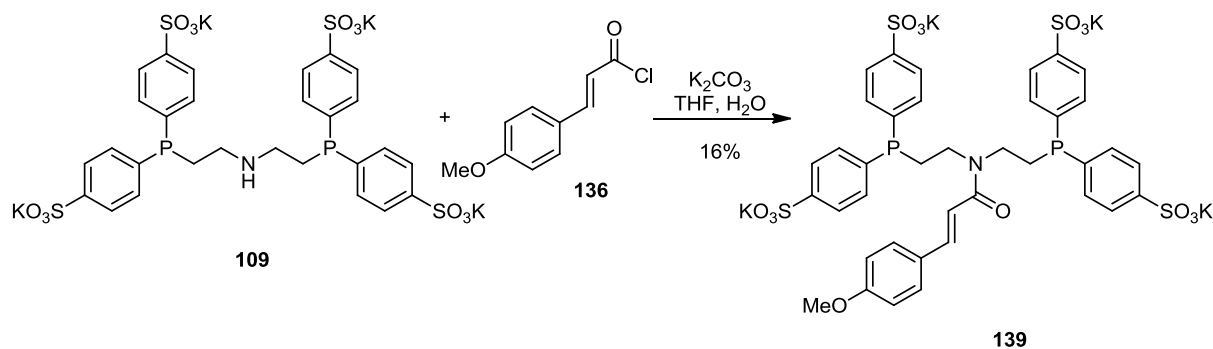


**Abb. 25:** Säurechloride für die Amidbindung.

Die Amidbildung konnte mit den Zimtsäurederivaten **137** (Schema 49) und **136** (Schema 50) und dem Crotonylsäurechlorid **135** (Schema 51) in geringen Ausbeuten erfolgreich durchgeführt werden. Die Reaktion mit Methacrylsäure führte zu nicht charakterisierten Nebenprodukten.

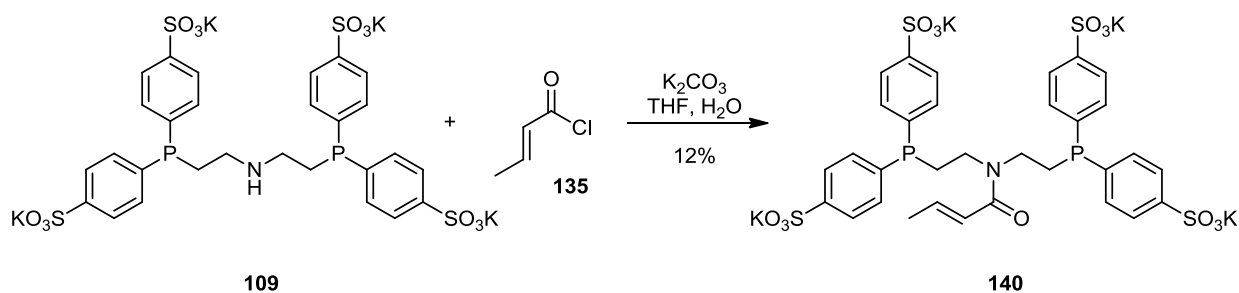


**Schema 49:** Synthese des *p*-Chlorzimtsäureamids **138**.



**Schema 50:** Synthese des *p*-Methoxyzimtsäureamids **139**.

## Durchführung



**Schema 51:** Synthese des Crotonylamids **140**.

Das erhaltene Crotonylamid **140** wurde unter den optimierten Reaktionsbedingungen der Dansylacrylamidanknüpfung mit dem Protein umgesetzt (Tabelle 4). In dem erhaltenen SDS-PAGE-Gel waren deutliche Proteinbanden zu sehen. Allerdings konnte aufgrund technischer Probleme kein Nachweis der Produktbildung über massenspektrometrische Analyse erfolgen. Ob der Ligand gebunden war oder das Protein frei vorlag, wurde in dieser Arbeit nicht festgestellt.

## 4.7 Kristallisationsansätze

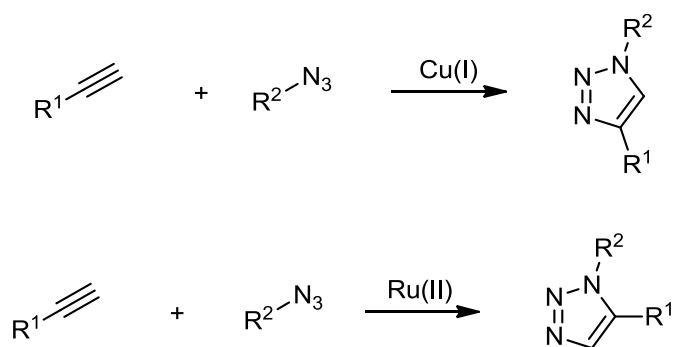
Für Röntgenkristallstrukturexperimente wurden verschieden Kristallisationsansätze des Proteins durchgeführt. Die Kristallisationsbedingungen wurden von Dr. *Johannes Schulze Wischeler* übernommen. Es wurden Kokristallisationsexperimente mit den Dansylderivaten **75** und **76**, mit dem Phosphin-Boran **94** und mit dem Bisdiphenylphosphin **85** durchgeführt. Zusätzlich wurden *hCA* II-H64C-Kristalle mit den gleichen Molekülen mit verschiedenen Konzentrationen einem *Soaking* unterworfen. Erhaltene Kristalle wurden am *Bessy II* (Beamline 14.2) in Berlin vermessen. In den Kristallstrukturen konnten die Moleküle nicht lokalisiert werden. Zum Teil konnte die kovalente Bindung an das Cystein beobachtet werden, aber der Rest der Moleküle war durch schlechte Besetzung und ungeordnete Anordnung nicht zu erkennen. Es kann keine Aussage über die Anordnung der Moleküle im Protein gemacht werden.



## 5 Clickchemie in der Carboanhydrase II

### 5.1 Einleitung

Die Suche nach Leitstrukturen zur Wirkstoffentwicklung ist meist ein aufwendiger Weg. Zunächst werden große Substanzbibliotheken erstellt, deren Substanzen anschließend mit Proteinen umgesetzt und in *High-Throughput-Screenings* (HTS) auf ihre Inhibitionswirkung ausgewertet werden. Eine Möglichkeit diese lange Entwicklung abzukürzen ist, das Protein selbst den affinsten Liganden synthetisieren zu lassen. Die „Target-Guided-Synthesis“ (TGS) nutzt kleinere Bibliotheken mit reaktiven Bausteinen, die durch eine günstige Anordnung der reaktiven Gruppen im Protein zueinander miteinander reagieren und die gewünschte Leitstruktur ergeben.<sup>[51]</sup> *Rideout* hat in den 80er Jahren als erster diese Methode entwickelt um *in situ* Cytotoxine aus zwei kleineren und weniger toxischen Molekülen, einem Hydrazin und einem Aldehyd, in menschlichen Zellen und Bakterien herzustellen.<sup>[52]</sup> Eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes ist *in situ* Clickchemie. Die orthogonale Reaktivität der Reaktanden zu den biologischen Systemen verhindert Nebenreaktionen mit dem Protein. Die von *Huisgen* entwickelte 1,3-dipolare Cycloaddition eines Azids mit einem Alkin erfüllt die Bedingungen einer Clickreaktion.<sup>[53,54]</sup> Sie ist biokompatibel, hat eine hohe Selektivität, einen nahezu vollständigen Umsatz und läuft im wässrigen Medium ab (Schema 52).

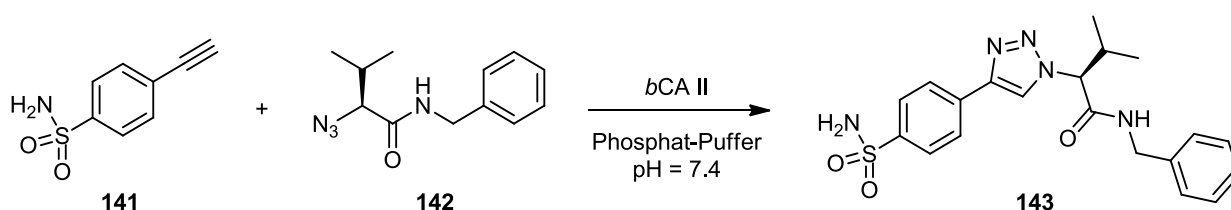


**Schema 52:** Ru(II)- und Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition eines Azids mit einem Alkin.

Die synthetische Anwendung der *Huisgen*-Cycloaddition war in den ersten 40 Jahren nach der Veröffentlichung durch fehlende Selektivitäten und harsche Reaktionsbedingungen, wie hohe Reaktionstemperaturen oder hohen Druck, eingeschränkt. Es wurden Gemische aus 1,4- und

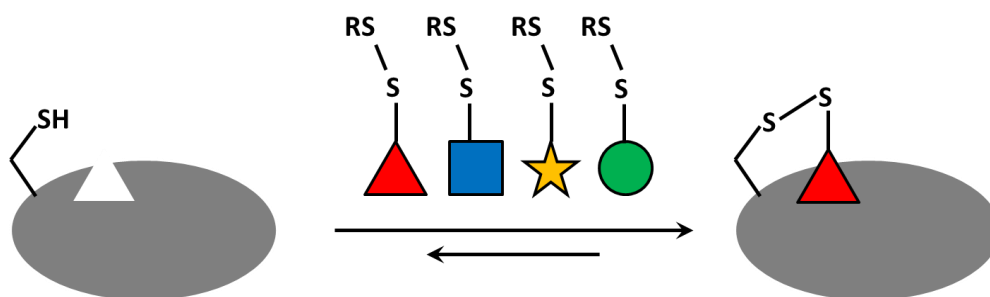
1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazolen erhalten.<sup>[55]</sup> Nachdem *Sharpless* den katalysierenden Einfluss von Kupfer(I) und Ruthenium(II) auf die Cycloaddition entdeckte, konnte die Reaktion bei Raumtemperatur selektiv durchgeführt werden. Mit Ruthenium(II) kann selektiv das 1,5-disubstituierte Triazol erhalten werden.<sup>[56]</sup> Mit Kupfer(I) wird selektiv das 1,4-disubstituierte Triazol erhalten, wobei die Kupfer(I)-Katalyse die Reaktion um den Faktor  $\sim 10^6$  beschleunigt.<sup>[57,58]</sup>

Die Gruppe von *Sharpless* konnte zeigen, dass die Cycloaddition eines Azids mit einem Alkin auch ohne Zugabe eines Übergangsmetallkatalysators in den beiden Proteinen Acetylcholinesterase (AChE)<sup>[59]</sup> und *boviner* Carboanhydrase II (bCA II)<sup>[60]</sup> stattfinden kann. Durch Affinitäten der Edukte zum Protein kommen die reaktiven Gruppen so nah zusammen, dass die Reaktion ablaufen kann, ohne dass weitere Energiezufuhr benötigt wird. In der bCA II wurde der Alkinbaustein über ein Arylsulfonamid im aktiven Zentrum verankert. Die am besten reagierenden Azide waren Aminosäurederivate wie beispielsweise das Valinderivat **142** (Schema 53).<sup>[60]</sup>



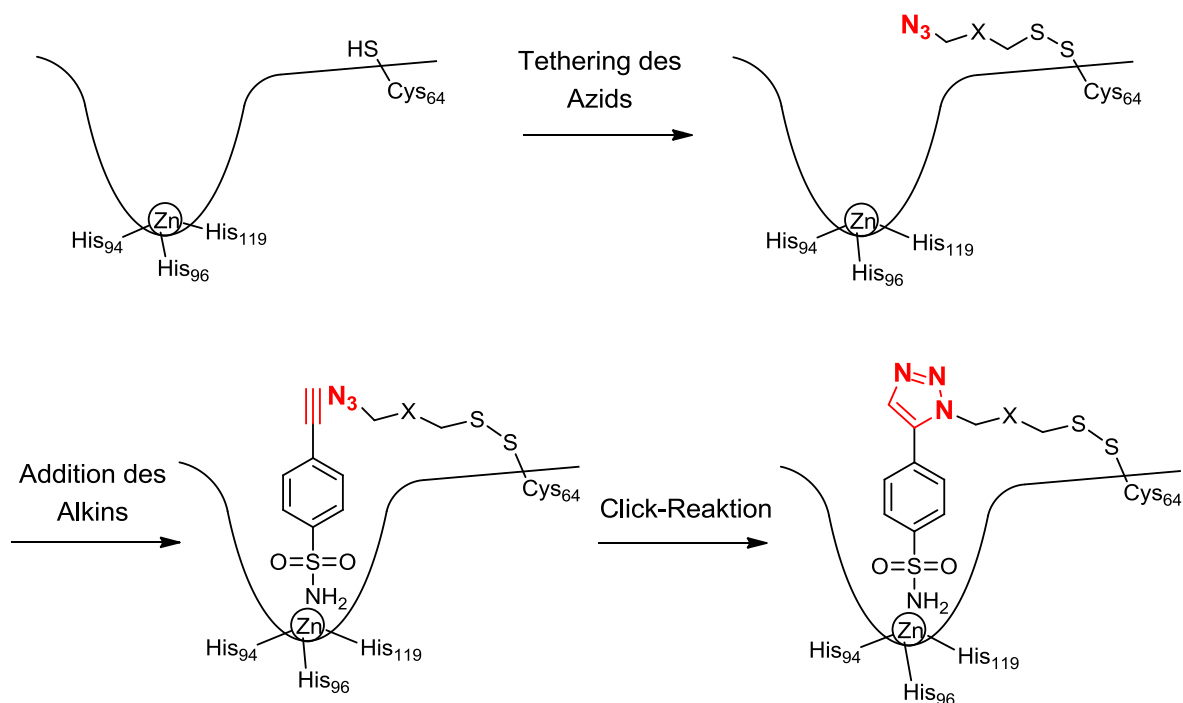
**Schema 53:** *Sharpless* ' Beispiel einer Clickreaktion in der bCA II.

Schwach affine Gruppen oder Moleküle können durch *Tethering*<sup>[61]</sup> der Moleküle an das Protein gefunden werden. Ein natürliches oder eingefügtes Cystein in der Nähe des aktiven Zentrums dient zur reversiblen Anknüpfung passender Substanzen einer Substanzbibliothek (Schema 54). Die Anknüpfung kann über Disulfidbrückenbildung unter reduktiven Bedingungen stattfinden. Der affinste Ligand bildet den stabilsten Komplex. Dieser Protein-Ligand-Komplex kann über massenspektrometrische Analysen nachgewiesen werden, da er kovalent an das Enzym gebunden ist. Das Finden einer Leitstruktur über massenspektrometrische Analysen ist im Gegensatz zum aufwendigen HTS mit geringerem technischem Aufwand möglich.



**Schema 54:** Darstellung der *Tethering*methode.

In dem Kooperationsprojekt der Arbeitsgruppen von Prof. *Klebe* und Prof. *Koert* sollte der *Tethering*ansatz mit der TGS verbunden werden. Es sollte eine 1,3-dipolare Cycloaddition eines Azids mit einem Alkin in einer Mutanten der *humanen* Carboanhydrase II durchgeführt werden. Das Azid sollte über eine Disulfidbrücke an das durch Mutation eingefügte Cys64 gebunden werden. Gleichzeitig sollte das Alkin über eine Arylsulfonamidgruppe im aktiven Zentrum verankert sein (Schema 55). Die Reaktion sollte dann ohne Zugabe oder mit Zugabe eines Übergangsmetalls durchgeführt werden und mittels Röntgenkristallstrukturanalyse und massenspektrometrischer Analysen beobachtet und die Produktbildung nachgewiesen werden.

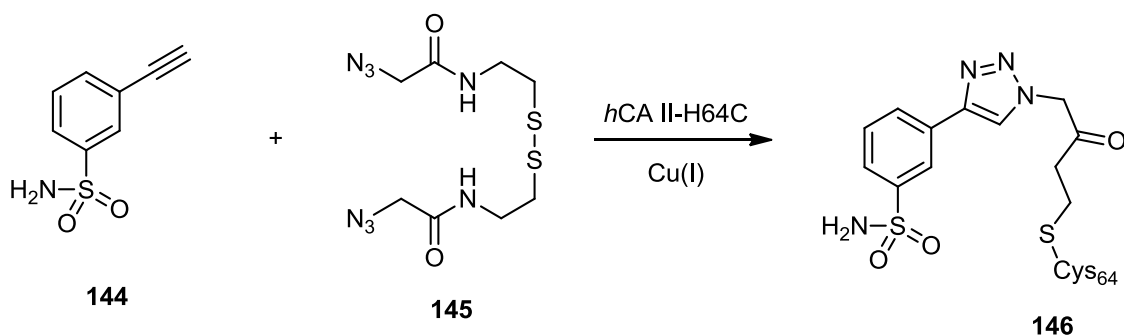


**Schema 55:** Darstellung der geplanten Versuchsanordnung in der *hCA II-H64C*.

Die benötigten Alkine und Azide wurden von Dr. *D. Sun* der Arbeitsgruppe *Koert* synthetisiert. Die Mutante *hCA II-H64C* wurde von Dr. *J. Schulze Wischeler* der Arbeitsgruppe *Klebe* hergestellt, exprimiert und kristallisiert. Die Proteinkristallstrukturverfeinerung und -deponierung und die Entwicklung und Auswertung der Masseexperimente wurden von Dr. *J. Schulze Wischeler* und mir durchgeführt. Ich habe in dem Projekt ab April 2009 mitgearbeitet.

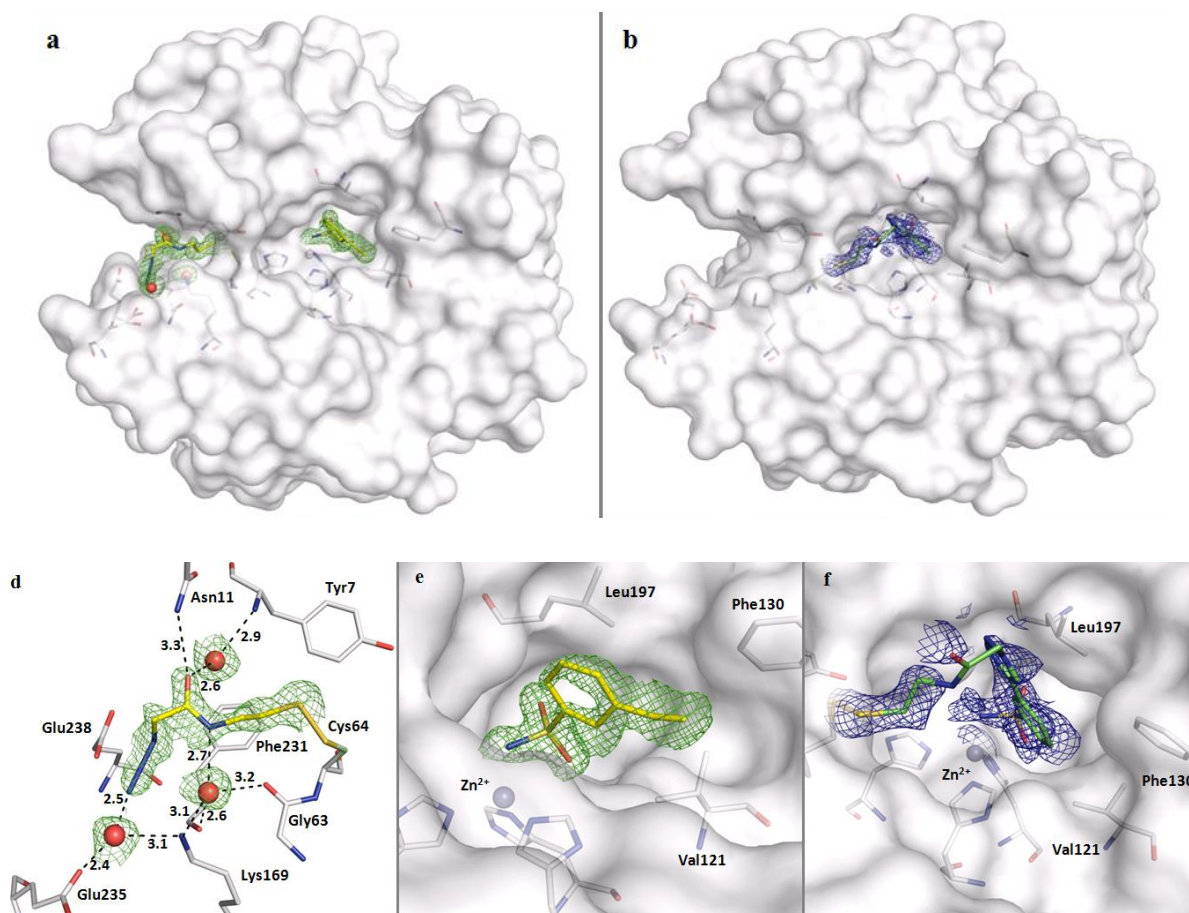
## 5.2 Durchführung

Mein Einstieg in das Projekt erfolgte zu einem Zeitpunkt, wo die Arbeiten bereits begonnen hatten. Dr. *J. Schulze Wischeler* konnte zeigen, dass Alkin **144** und Azid **145** in der *hCA* II-H64C unter Zugabe von Cu(I) selektiv zum 1,4-disubstituierten Triazol reagierten (Schema 56).<sup>[43]</sup>



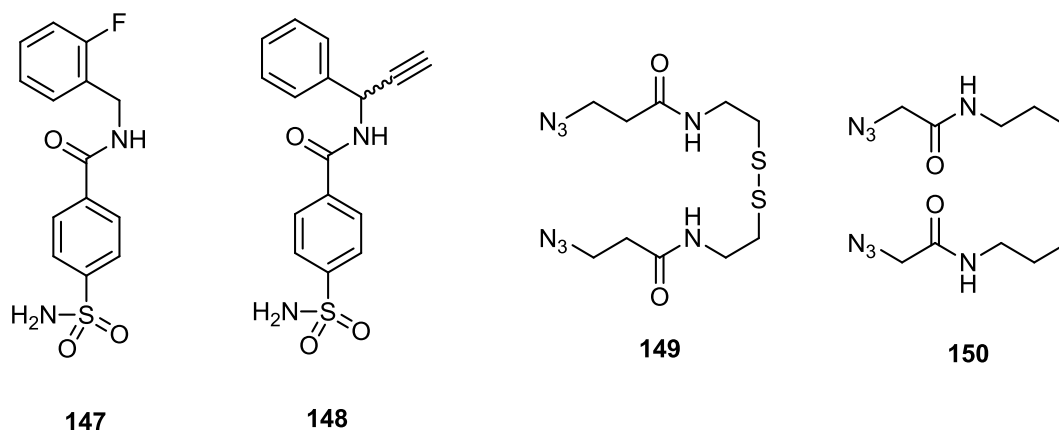
**Schema 56:** 1,3-dipolare Cycloaddition von Alkin **144** und Azid **145** in *h*CA II-H64C von Dr. *J. Schulze Wischeler*.

Von Dr. J. Schulze Wischeler aufgenommene Röntgenkristallstrukturen zeigten, dass die reaktiven Gruppen des Azids **144** und des Alkins **145** sich in entgegengesetzten Richtungen an der Oberfläche des Proteins orientierten (Abb. 26: a,d,e). Nach der Zugabe von Kupfer(I) wurde eine veränderte Differenzelektronendichte erhalten, die eine Triazolbildung nahelegt, aber aufgrund einer zu schwach definierten Elektronendichte nicht eindeutig zu beweisen war (Abb. 26: b,f). Über massenspektrometrische Analysen konnte die Produktbildung allerdings nachgewiesen werden.<sup>[43]</sup>



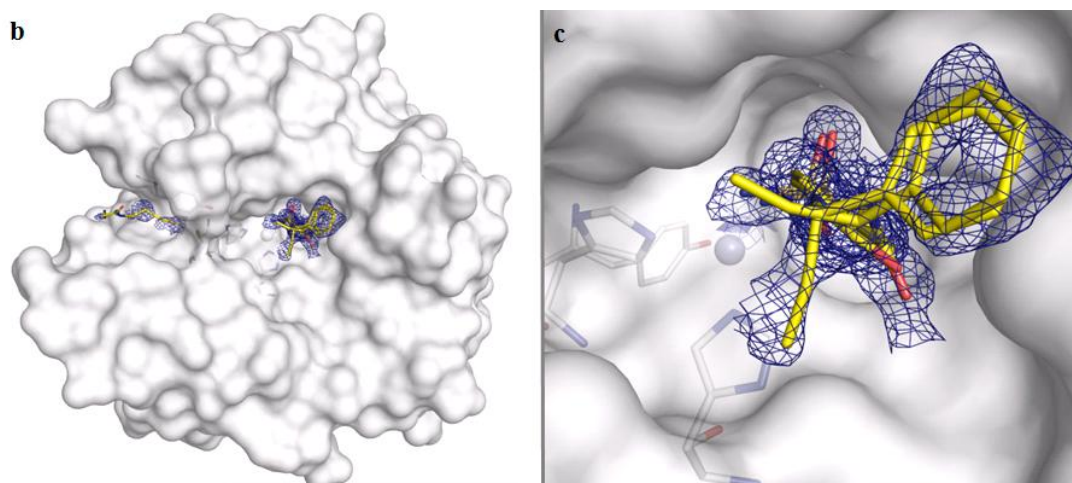
**Abb. 26:** Kristallstruktur des Alkins **144** und des Azids **145** vor (a,d,e) und nach (b,f) Zugabe von Kupfer(I). Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche des Proteins ist weiß dargestellt. a) Kristallstruktur des Alkins **144** und Azids **145** in *hCA II-H64C* (pdb-Code: 3KIG). Die  $F_o-F_c$  Dichte ist für  $\sigma = 2.0$  als grünes Netz angezeigt. b) Kristallstruktur nach Inkubation mit Kupfer für 48 h. Die  $2F_o-F_c$  Differenzdichte ist für  $\sigma = 1.0$  als blaues Netz angezeigt. Das mögliche Cycloadditionsprodukt **146** ist grün dargestellt. d) Vergrößerte Ansicht des Azids **145** (gelb). Abstände sind in Å angegeben. e) Vergrößerte Ansicht des Alkins **144** (gelb). f) Vergrößerte Ansicht des möglichen Triazols **146**.<sup>[43]</sup>

Die beiden Bausteine für die Clickreaktion wurden dahingehend optimiert, dass sie verlängert wurden, um im Enzym dichter beieinander zu liegen. Zusätzlich sollten sie eine höhere Mobilität aufweisen und nicht von unerwünschten stabilisierenden Wechselwirkungen an der Reaktion gehindert werden. Der Alkin-Baustein **144** wurde von dem aus einer pdb-Struktur bekannten Inhibitor **147** abgeleitet (pdb-Code: 1G1D). Alkin **148** besitzt ein Stereozentrum. Durch eine racemische Synthese wurde die Möglichkeit einer Stereodiskriminierung durch das Protein erhalten. Die Azidbausteine **149** und **150** entstanden durch Verlängerung von Azid **145** um eine Kohlenstoffeinheit an der Seite des Schwefels (**150**) oder an der Seite des Azids (**149**) (Abb. 27). Die Azide wurden als über eine Disulfideinheit verbrückte Dimere synthetisiert und eingesetzt.



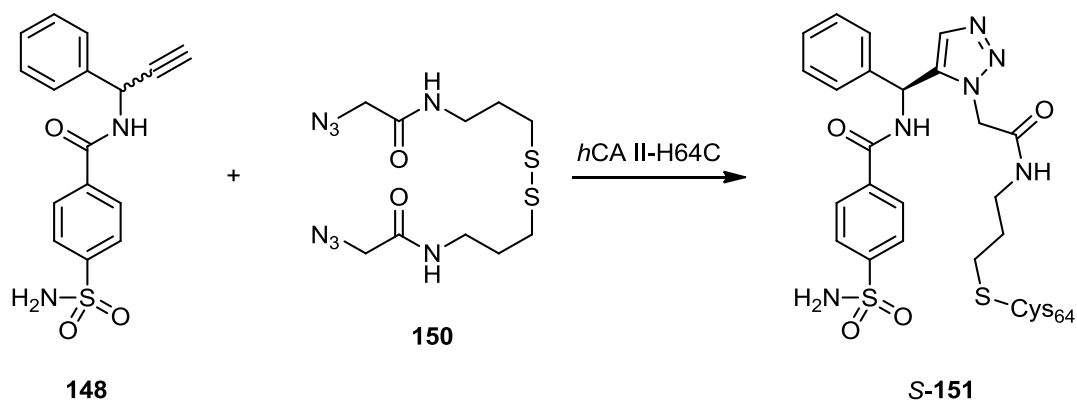
**Abb. 27:** CA II-Inhibitor **147** und davon abgeleitetes Alkin **148** und die optimierten Azide **149** und **150**.

Für einen ersten Einblick in das optimierte System wurde Azid **150** unter reduktiven Bedingungen mit *h*CA II-H64C kokristallisiert und anschließend für 2 h mit dem Alkin **148** einem *Soaking* unterworfen. Die erhaltene Kristallstruktur zeigt, dass das Azid **150** nicht mehr über ein Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk immobilisiert war, sondern mit höherer Flexibilität im Protein vorlag. Die schwach definierte Elektronendichte und die hohen B-Werte für die terminalen Atome des Azids wiesen dies nach. Das Alkin **148** lag racemisch im aktiven Zentrum vor, was zu einer schwach definierten Elektronendichte der Alkingruppe führte (Abb. 28).

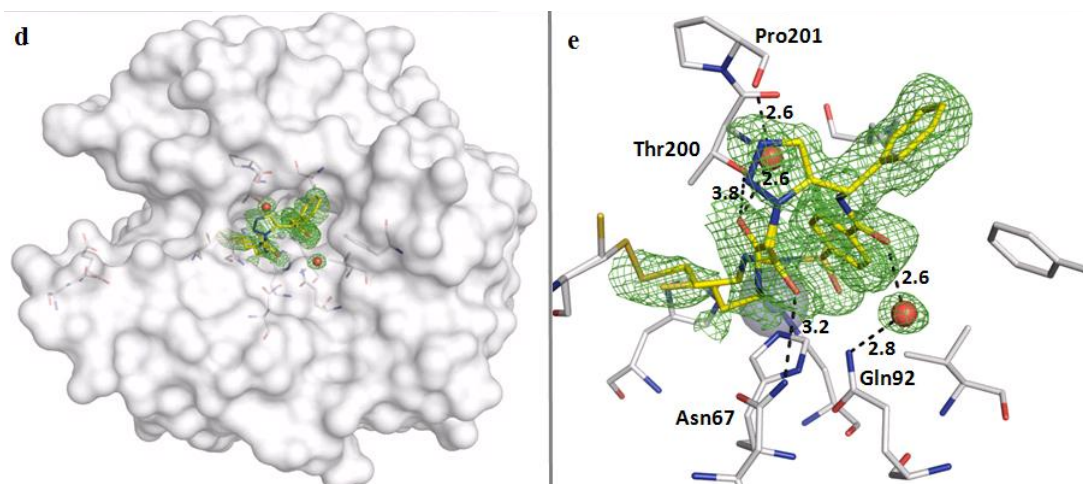


**Abb. 28:** Kristallstruktur von Alkin **148** und Azid **150** in *hCA* II-H64C. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche des Proteins ist weiß dargestellt. Die  $2F_o - F_c$  Differenzdichte ist für  $\sigma = 1.0$  als blaues Netz angezeigt: links: Übersicht; rechts: Vergrößerte Ansicht des racemisch vorliegenden Alkins **148** (gelb).<sup>[43]</sup>

Ein zweiter Kristallisationsansatz wurde mit *hCA* II-H64C, Azid **150** und Alkin **148** in einer Kokristallisation durchgeführt. Nach zwei Monaten wurde die Kristallstruktur vermessen und verfeinert. Die Differenzelektronendichte zeigte das 1,5-disubstituierte Cycloadditionsprodukt **151** mit *S*-konfiguriertem Stereozentrum (Abb. 29, Schema 57). Die Reaktion ist ohne die Zugabe von Kupfer(I) abgelaufen.

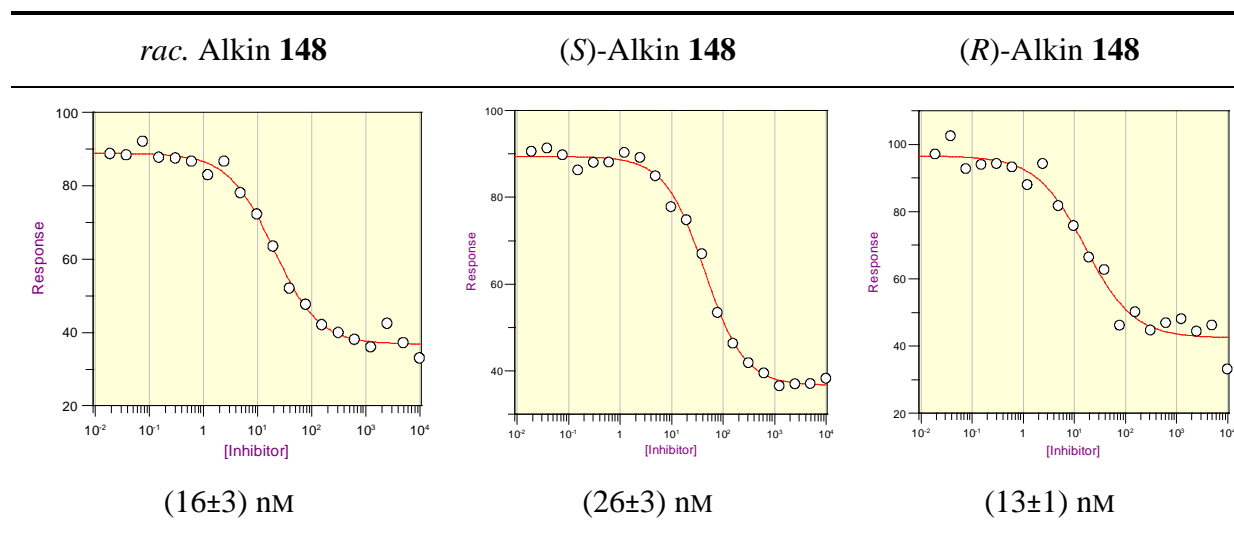


**Schema 57:** Cycloaddition im Kristall der *hCA* II-H64C zum Triazol **151**.



**Abb. 29:** Kristallstruktur des Triazols **151** (gelb, pdb-Code: 3KNE). Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche des Proteins ist weiß dargestellt. Die  $F_o-F_c$  Dichte ist für  $\sigma = 2.0$  als grünes Netz angezeigt: links: Übersicht; rechts: Vergrößerte Ansicht. Abstände sind in Å angegeben.<sup>[43]</sup>

Über einen photometrischen Bioassay nach *Pocker* und *Stone*<sup>[62]</sup> mit *p*-Nitrophenylacetat als Substrat wurden die  $IC_{50}$  Werte bestimmt (Tab. 6). Als Referenz wurde Acetazolamid mit einem  $IC_{50}$  von  $2.9 \text{ nM} \pm 0.3 \text{ nM}$  (Lit.<sup>[63]</sup>:  $3.4 \text{ nM}$ ) gemessen.



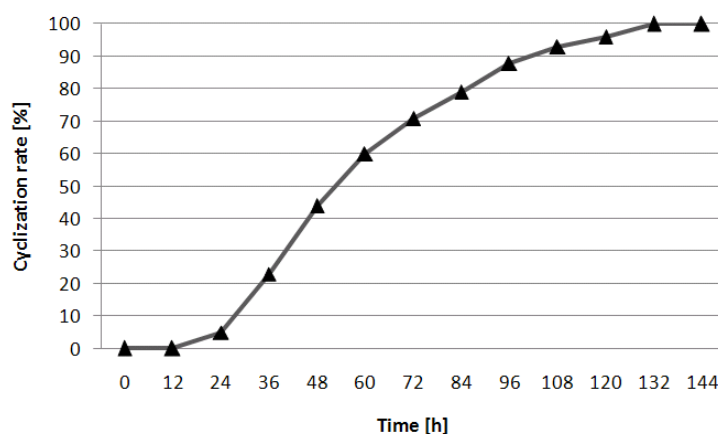
**Tabelle 6:**  $IC_{50}$ -Kurven von *rac.* Alkin **148**, (*S*)-Alkin **148** und (*R*)-Alkin **148**.

Der geringe Affinitätsunterschied von 26 nM zu 13 nM der beiden Enantiomere führte über zwei Wochen zur selektiven Bildung des *S*-konfigurierten Produktes *S*-**151**. Der lange Zeitraum ist für die Differenzierung wichtig. Nach einem *Soaking* von 2 h des Protein-Azid-



Kristalls mit dem Alkin **148** konnte das Racemat in der Kristallstruktur beobachtet werden (Abb. 28). Zusätzlich zur höheren Affinität wirkt die räumliche Anordnung des *R*-Enantiomers im Kristall günstiger für die Reaktion mit dem Azid.

Um den Reaktionsverlauf beschreiben zu können, wurden Cycloadditionsexperimente in Lösung durchgeführt und anschließend mit HPLC-MS Analysen ausgewertet. Da das Azid **150** kovalent an das Protein gebunden ist, muss ein um die Masse des Azids erhöhtes Proteinsignal erhalten werden. Nach erfolgreicher Cycloaddition muss das Proteinsignal um die Masse des Triazols **151** erhöht sein. Zunächst wurde die *hCA* II-H64C mit dem Azid **150** inkubiert, was zu dem gewünschten Proteinsignal von 29902 Da (29729 Da + 173 Da) führte. Anschließend wurde das racemische Alkin **148** hinzugegeben und die Reaktion bei verschiedenen Temperaturen 37 °C für 12-144 h mit und ohne Cu(I)-Zugabe durchgeführt und über HPLC-MS Analysen ausgewertet. Die Ausbeuten wurden über die Integralverhältnisse der Peaks zueinander bestimmt. Unter Zugabe von Kupfer läuft die Reaktion schneller ab. Allerdings entsteht ein zusätzliches Massesignal bei 29693 Da, welches nicht zugeordnet werden konnte. Die Reaktion war temperaturabhängig: ohne Kupferzugabe sind nach 96 h bei Raumtemperatur etwa 12%, bei 37 °C über 80% Triazol **151** gebildet worden (Abb. 30).



**Abb. 30:** Reaktionsverlauf der Cycloaddition von Alkin **148** und Azid **150** in *hCA* II-H64C bei 37 °C.<sup>[43]</sup>

Um zu verifizieren, dass die beobachtete Reaktion im Enzym stattfindet, wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt. In einem ersten Experiment wurden die beiden Edukte zum Protein gegeben und nach einer kurzen Inkubationszeit die Reaktionslösung über eine Größenausschlusschromatographie gereinigt, so dass nicht gebundene Edukte abgetrennt wurden. Die Cycloaddition in der Proteinlösung mit kovalent gebundenem Azid und

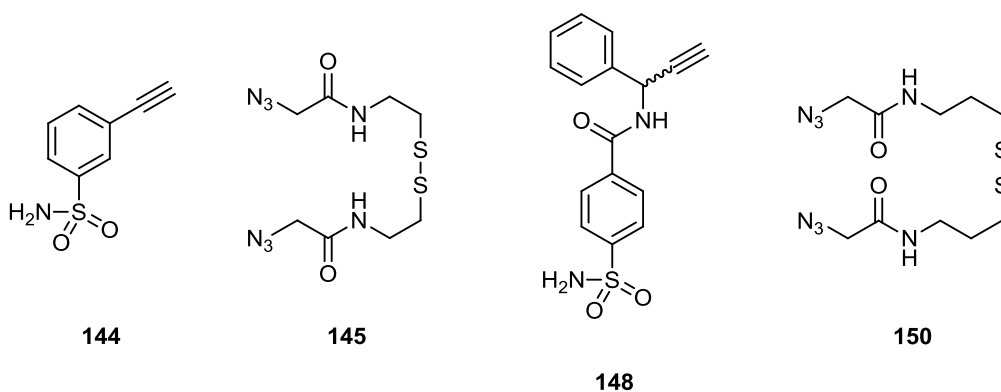
koordiniertem Alkin fand mit gleicher Geschwindigkeit statt. In einem zweiten Experiment wurde das aktive Zentrum mit dem CA II-Inhibitor Ethoxolamid blockiert. Es fand trotz kovalent gebundenem Azid **150** und zugegebenem Alkin **148** keine Triazolbildung statt. In einem dritten Versuch wurden zu dem Protein-Azid-Komplex verschiedene Alkine gegeben, die keine Affinität zum aktiven Zentrum besaßen. Es wurde keine Triazolbildung beobachtet. Aufgrund dieser Experimente kann davon ausgegangen werden, dass die Cycloaddition im aktiven Zentrum des Proteins stattfindet.

## 6 Zusammenfassung

Artifizielle Hybridenzyme haben ein großes Potential komplexe chemische Reaktionen zu katalysieren. Dies wird möglich durch die Kombination eines großen Reaktionsrepertoires und einer höheren Substratbreite des chemischen Katalysators und einer Selektivität der enzymatischen Umgebung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Ansätze zur Herstellung von Hybridenzymen bearbeitet. Als Protein wurde eine Mutante der *humanen* Carboanhydrase II (*hCA* II) verwendet, welche an der Stelle 64 statt eines Histidins ein Cystein (Cys64) besitzt. Das Cys64 wurde zur kovalenten Anknüpfung von synthetisch hergestellten Molekülen verwendet. Mithilfe des *Tetherings* können Moleküle mit schwachen Affinitäten zum Enzym gefunden werden und die Analytik der Enzym-Molekül-Verbindungen kann über massenspektrometrische Analysen erfolgen.

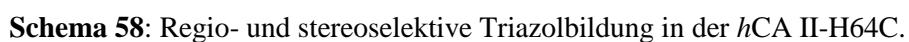
In einem Kooperationsprojekt der Arbeitsgruppen von Prof. *Klebe* und Prof. *Koert* sollte eine *Huisgen*-Cycloaddition in der *hCA* II-H64C durchgeführt werden. Die Azide (**145** und **150**) wurden kovalent über eine Disulfidbindung an das Cys64 gebunden. Die Alkine (**144** und **148**) besaßen eine Arylsulfonamidgruppe, die eine hohe Affinität zum Zink(II)-Ion aufweist und zu einer Verankerung des Alkins im aktiven Zentrum führte.

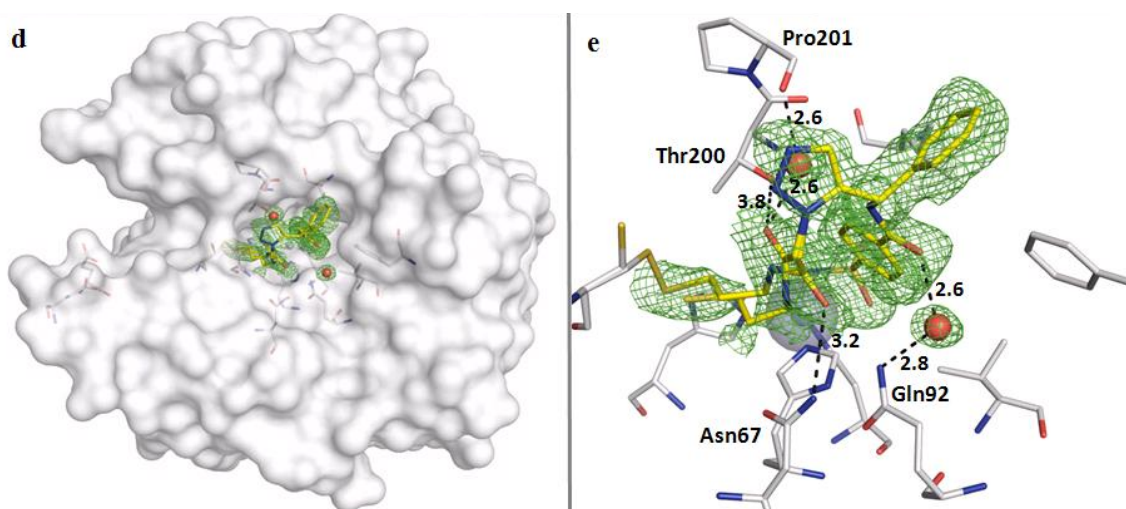


**Abb. 31:** Alkin **144**, Azid **145** und Alkin **148** und Azid **150**.

Kristallstrukturanalysen bewiesen, dass Alkin **144** und Azid **145** aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Protein in entgegengesetzte Richtungen zeigten (Abb. 32). Durch die Zugabe von Kupfer(I) fand eine langsame Triazolbildung statt, was in einer Kristallstruktur angedeutet wurde (Abb. 32) und über Massenexperimente bewiesen werden konnte.

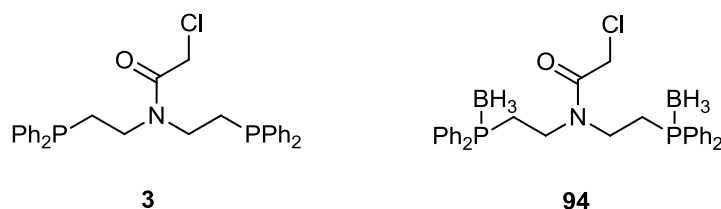
Zur Anpassung der Edukte an das Enzym wurden beide Moleküle verlängert. Mit Alkin **148** und Azid **150** fand ohne Zugabe von Kupfer(I) eine *Huisgen*-Cycloaddition im Kristall und in Lösung statt. In der Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion regio- und stereoselektiv zum 1,5-*S*-Triazol **151** ablief (Schema 58, Abb. 33). Die erhaltene Selektivität konnte durch Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte der enantiomerenreinen Alkine *R*-**148** (13 nM) und *S*-**148** (26 nM) bestätigt werden. Mithilfe von massenspektrometrische Analysen konnte die Umsatzrate zeitabhängig untersucht werden. Verschiedene Kontrollexperimente konnten zeigen, dass die Cycloaddition in der *hCA* II-H64C stattgefunden hat.





**Abb. 33:** Kristallstruktur des Triazols *S*-151 (gelb, pdb-Code: 3KNE). Die  $F_o-F_c$  Dichte ist für  $\sigma = 2.0$  als grünes Netz angezeigt. links: Übersicht: Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche des Proteins ist weiß dargestellt. rechts: vergrößerte Ansicht. Abstände sind in Å angegeben.<sup>[43]</sup>

Der Schwerpunkt der Arbeit war die Synthese phosphinhaltiger Liganden für die kovalente Anknüpfung an ein Cystein im Protein. Über Docking-Experimente wurde validiert, dass die geplanten Moleküle zu einer sinnvollen Anordnung im Protein kommen können. Mithilfe von Dansylderivaten mit Halogenacetamid- und einer Acrylamidgruppe wurde die Reaktivität des Cys64 in der *hCA* II-H64C getestet und Kupplungsbedingungen in Lösung optimiert. Dansylchloracetamid **75** konnte selektiv mit einer Ausbeute von 75% und das weniger reaktive Dansylacrylamid **76** mit einer Ausbeute von 40% an Cys64 gekuppelt werden. Die Selektivität für das Cys64 in Anwesenheit des natürlich vorkommenden Cys205 konnte über tryptischen Verdau nachgewiesen werden. Eine Kristallstruktur des Protein-Dansyl-Komplexes wurde nicht erhalten.

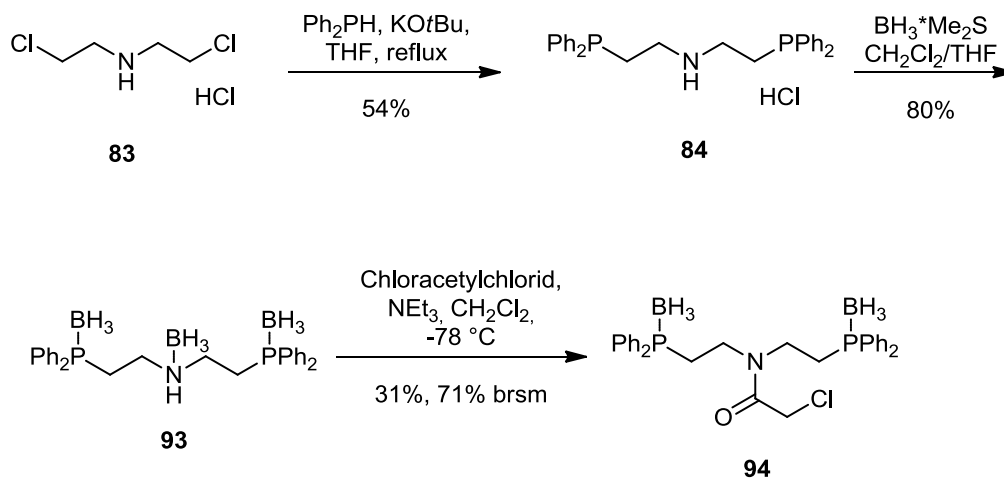


**Abb. 34:** geplantes Phosphin **3** und borangeschütztes Phosphin **94**.

Das geplante Phosphin **3** (Abb. 34) mit Chloracetamidgruppe konnte nicht synthetisiert werden, da es intramolekular reagierte. Durch Schützung der beiden Phosphine mit Boranen

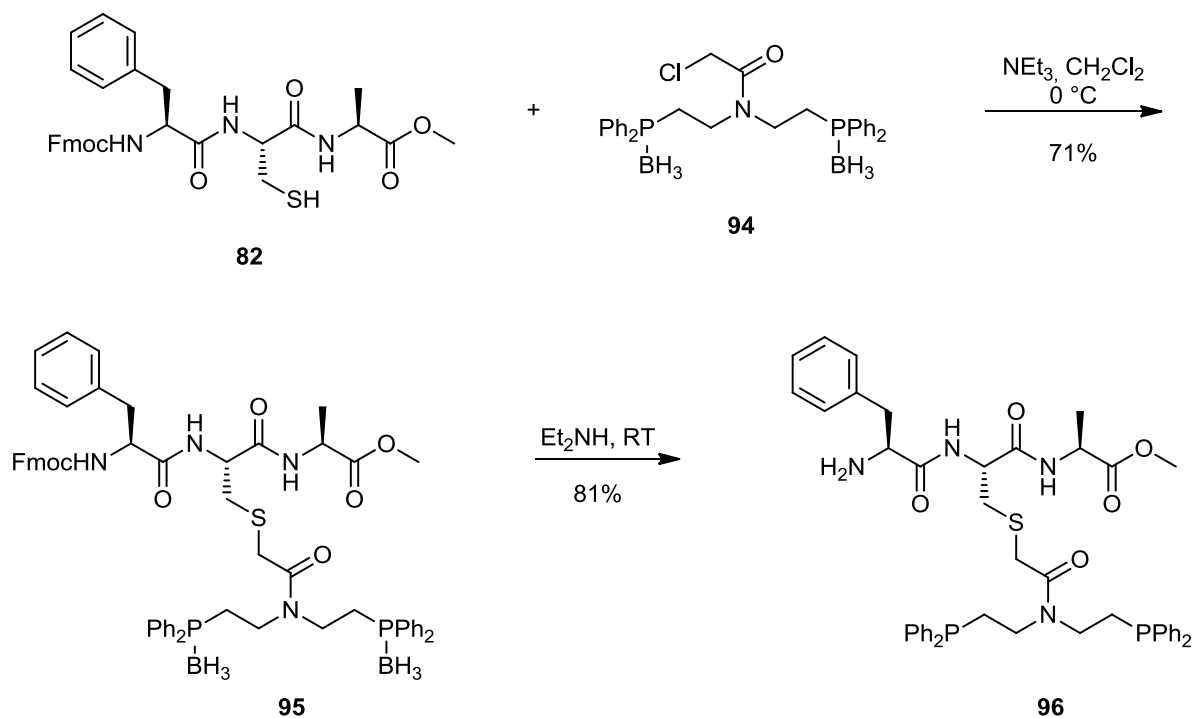
## Zusammenfassung

konnte das Chloracetamid **94** in 3 Stufen und einer Gesamtausbeute von 13% (31% brsm) hergestellt werden (Schema 59).

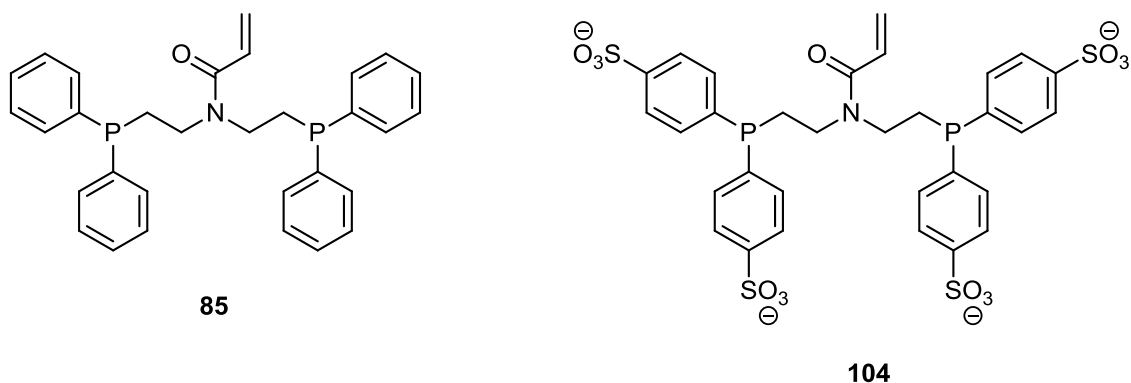


**Schema 59:** Synthese des borangeschützten Phosphins **94**.

Das borangeschützte Phosphin **94** konnte mit einer Ausbeute von 71% an das Tripeptid **82** gekuppelt werden und anschließend das Phosphinpeptid **95** mit Diethylamin mit einer Ausbeute von 81% zum freien Phosphin **96** entschützt werden (Schema 60). Kupplungsversuche mit der *h*CA II-H64C in Lösung und im Kristall führten jedoch nicht zum gewünschten Produkt.

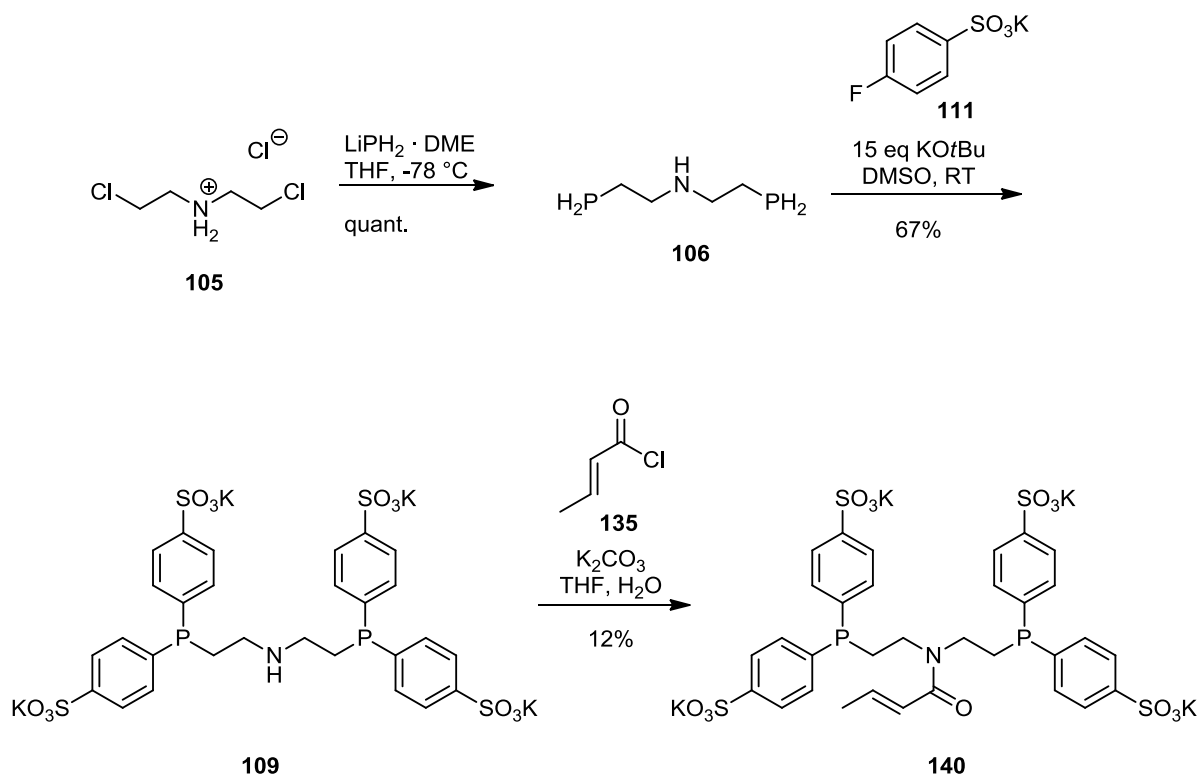


**Schema 60:** Kupplung des borangeschützten Phosphins **94** an das Tripeptid FmocPheCysAlaOMe mit anschließender Entschätzung.



**Abb. 35:** Whitesides' Phosphin **85** und das wasserlösliche Phosphin **104**.

Das von Whitesides entwickelte Phosphin **85** konnte analog zur Literatur synthetisiert werden (Abb. 35). Kupplungsversuche mit der *hCA* II-H64C in Lösung und im Kristall führten nicht zum gewünschten Produkt. Um eine bessere Wasserlöslichkeit zu erhalten wurde das wasserlösliche Phosphinacrylamid **104** (Abb. 35) entwickelt, welches allerdings bis zur letzten Stufe nicht synthetisiert werden konnte. Das freie Phosphinamin **109** konnte nach viel Optimierungsarbeit in 2 Stufen und einer Gesamtausbeute von 67% hergestellt werden (Schema 61).



**Schema 61:** Synthese des wasserlöslichen Phosphinamins **109** und des Crotonylamids **140**.

## Zusammenfassung

Die Amidbildung war mit unfunktionalisierten Anhydriden, wie Essigsäureanhydrid und Propionsäureanhydrid, möglich. Die reaktivsten Säurederivate, die zur Amidbindung führten, waren Crotonylsäurechlorid (12% Ausbeute), *p*-Methoxyzimtsäurechlorid (16% Ausbeute) und *p*-Chlorzimtsäurechlorid (27% Ausbeute). Ein Kupplungsversuch des Crotonylamids **140** an die *h*CA II-H64C in Lösung konnte wegen analytischer Probleme nicht mehr ausgewertet werden.

Das in dieser Arbeit entwickelte und synthetisierte wasserlösliche Phosphin als Amin **109** oder Crotonylamid **140** birgt Potential zur Weiterentwicklung von artifiziellen Metalloenzymen. Durch die sehr gute Wasserlöslichkeit kann es ohne Zugabe von organischen Lösungsmitteln wie DMSO oder Acetonitril zu Proteinen in wässrigen Pufferlösungen gegeben werden. Ob die Reaktivität des Crotonylamids **140** reicht, um mit einem Cystein im Protein zu reagieren, kann Gegenstand künftiger Arbeiten sein.

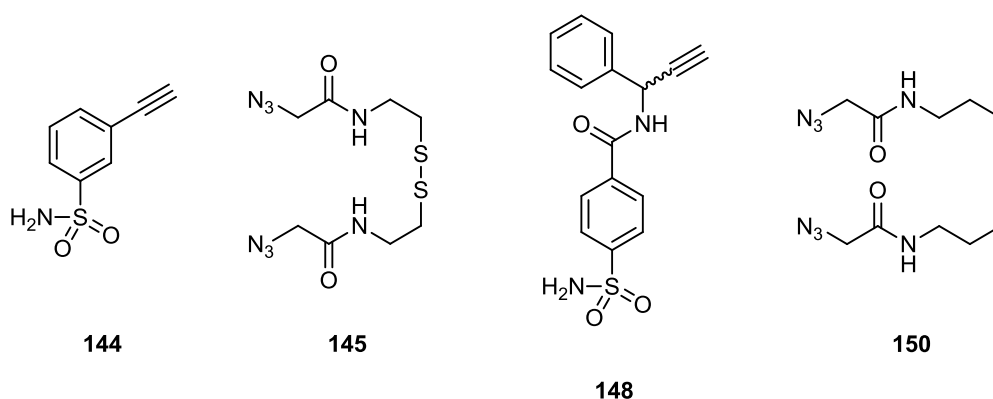


## 7 Summary

Artificial hybrid enzymes have great potential in catalyzing complex chemical reactions, as they combine a larger reaction repertoire and broader substrate scope of the chemical catalysts with the specific selectivity of an enzyme environment.

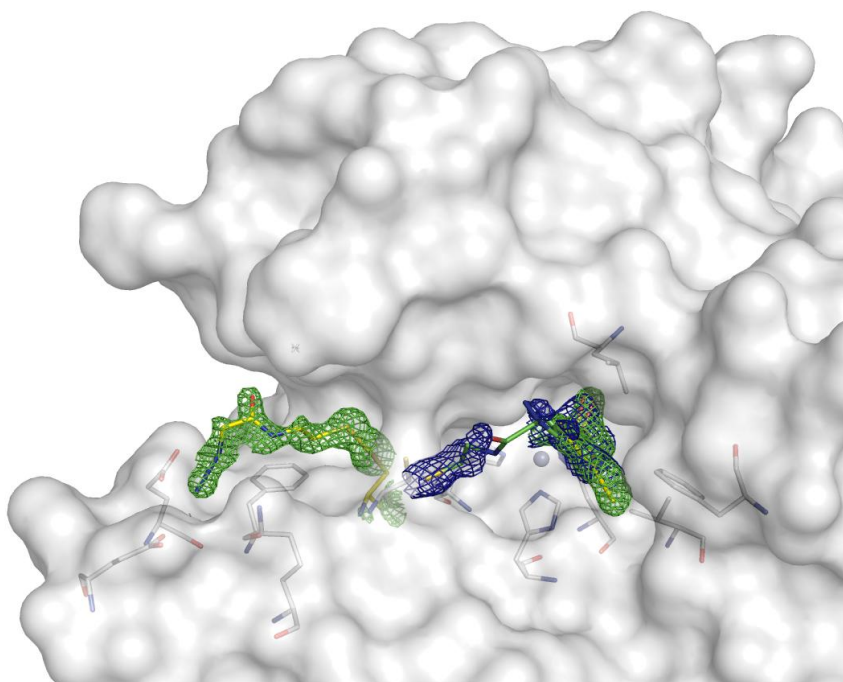
In this thesis, two different approaches for synthesizing artificial hybrid enzymes were performed. A mutant of *human* Carbonic Anhydrase II (*hCA* II) with a cysteine (Cys64) at position 64 was applied as target protein. Cys64 was used to covalently attach synthesized molecules. Via tethering it is possible to find molecules with a weak affinity to the enzyme. In addition, the chemical analysis of the formed enzyme-molecule bond was proved by mass spectrometric analysis.

In a first approach, a cooperation project of the working groups of Prof. *Klebe* and Prof. *Koert*, a *Huisgen* cycloaddition was performed within the active site of *hCA* II-H64C. The azides (**145** and **150**) were covalently bound via a disulfide bond to Cys64. The alkynes (**144** and **148**) contained an arylsulfonamide, which has a good affinity to the zinc(II) ion, thus anchoring the alkynes in the active site.



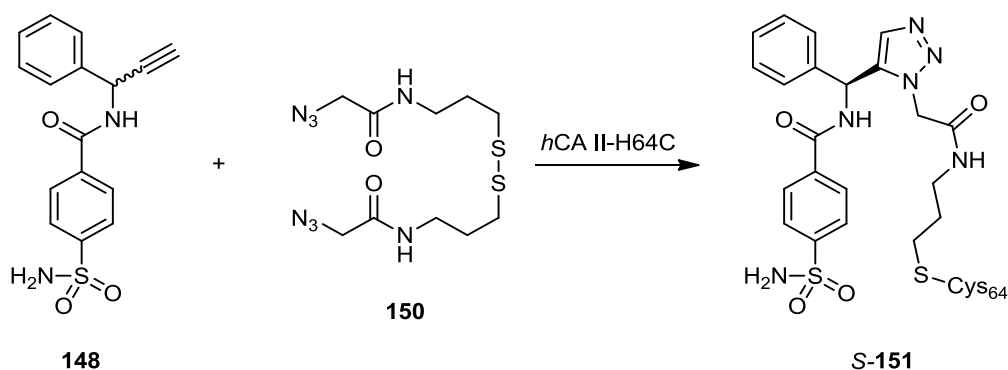
**Figure 31:** Alkyne-azide pairs for cycloaddition: alkyne **144** and azide **145**; alkyne **148** and azide **150**.

Protein crystallography indicated that alkyne **144** and azide **145** pointed in opposite direction stabilized by interactions with the protein surface (Fig. 32). The addition of copper(I) induced a slow triazole formation that was suggested by crystal structure and proved by mass spectrometric analysis.

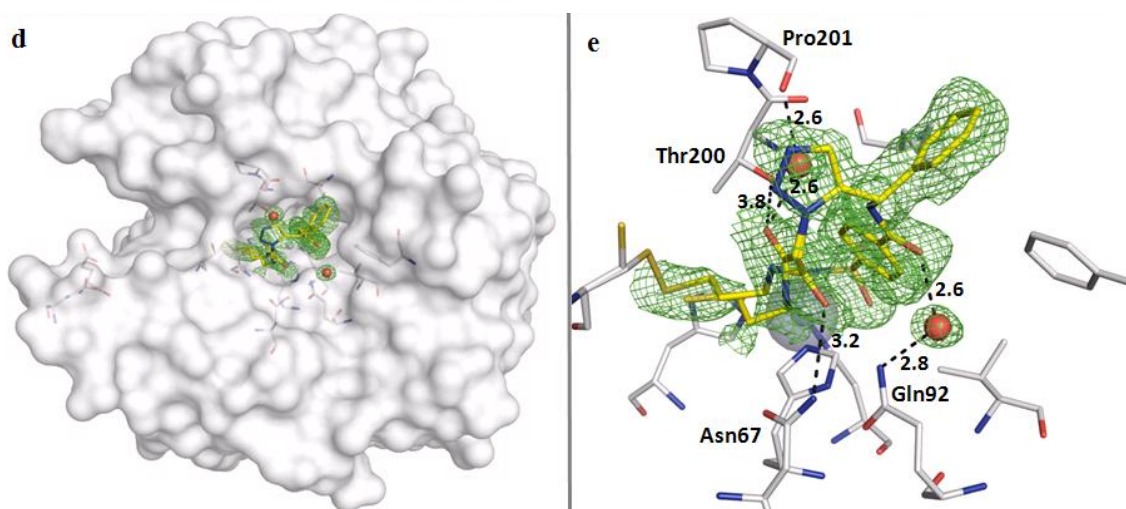


**Figure 32:** Crystal structure of the click product superimposed with the arrangement of the reactants alkyne **144** and azide **145** before cycloaddition. The  $F_o-F_c$  omit map for the reactants is shown at a level of  $\sigma = 2.0$  as a green mesh. The  $2F_o-F_c$  omit map for the cycloaddition product is shown at a level of  $\sigma = 1.0$  as blue mesh.

For optimizing the building blocks, the azide and alkyne component were elongated. In situ, alkyne **148** and azide **150** formed the triazole **151** within the crystal without the addition of copper(I). The crystal structure showed that the reaction proceeded in a regio- and stereoselective manner forming only 1,5-*S*-triazole **151** (Scheme 58, Fig. 33). Inhibition data were measured in a bioassay for alkynes *R*-**148** (26 nM) and *S*-**148** (13 nM) indicating the same selectivity. Via mass spectrometric analysis it was possible to record the time dependency of the reaction. Several control experiments showed that the cycloaddition took place within *hCA* II-H64C.

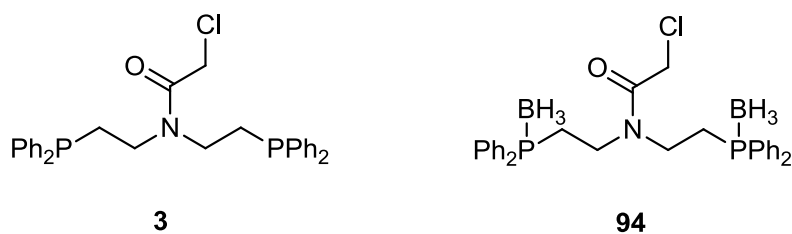


**Scheme 58:** Regio- and stereoselective triazole formation within *hCA* II-H64C.



**Figure 33:** Crystal structure of triazole **151** (pdb-Code: 3KNE). The solvent-accessible surface of the protein is represented in white. The  $F_o - F_c$  omit map is shown at a level of  $\sigma = 2.0$  as green mesh. Left-hand: overview; right-hand: close-up view. Distances are shown in Å.<sup>[43]</sup>

In a second approach, a phosphine-containing complex should be tethered covalently to the Cys64. The focus of the work was the synthesis of chelating diphosphines for a covalent attachment via a cysteine exposed to the surface of the protein. Docking experiments revealed that the molecules should be able to react in the designed way due to their putative arrangements within the active site. By means of dansyl derivatives with halogen acetamides and acrylamide groups, coupling conditions were tested and optimized in solution for the reaction with Cys64 of *hCA* II-H64C. Dansylchloroacetamide **75** could be coupled selectively with a yield of 75% and the less reactive dansylacrylamide **76** with a yield of 40% to Cys64. The selectivity for Cys64 in the presence of the naturally occurring Cys205 could be verified by tryptical digestion. No crystal structure could be obtained to characterize the binding.

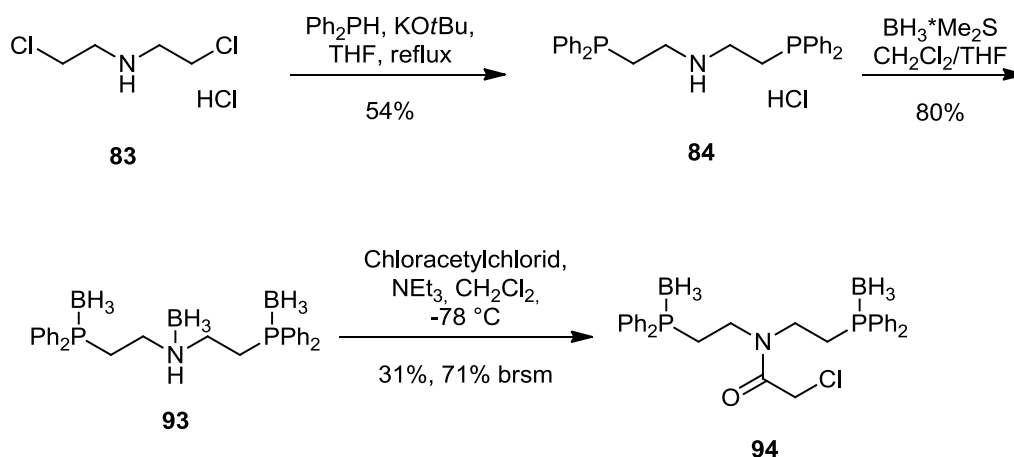


**Figure 34:** Planned phosphine **3** and borane-protected phosphine **94**.

The planned phosphine molecule with a chloroacetamide group **3** (Fig. 34) could not be synthesized due to an undesired intramolecular side reaction. By protecting the phosphines

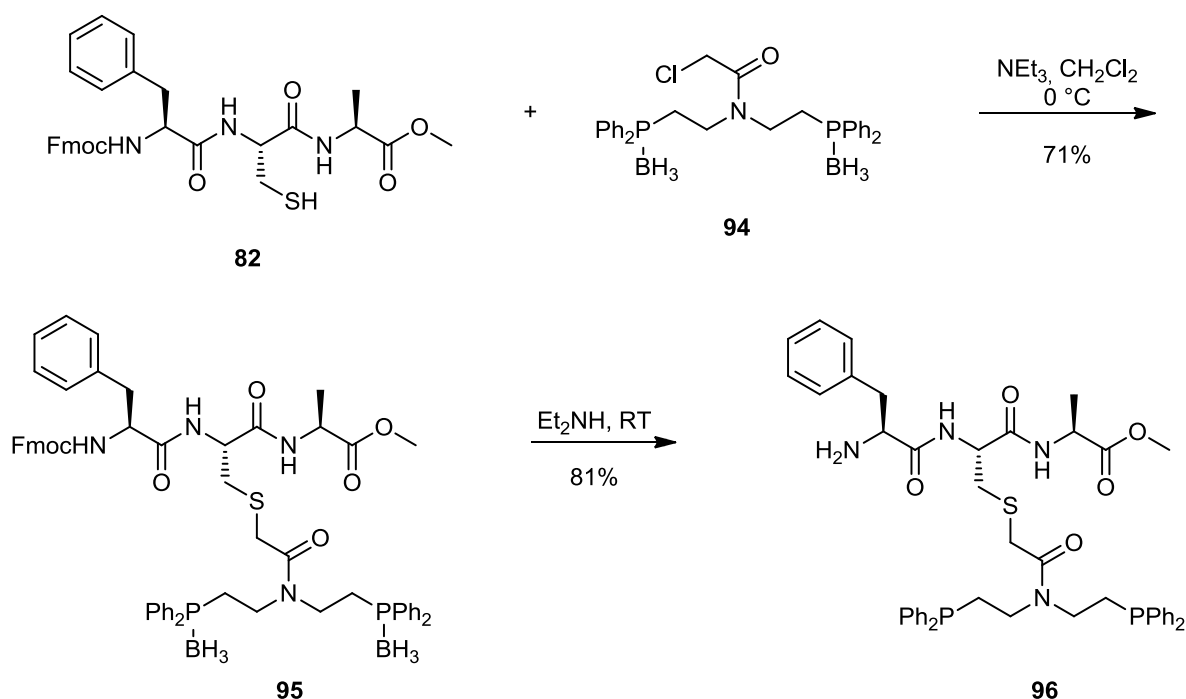
## Summary

with boranes it was possible to introduce a chloroacetamide to give phosphine **94** in 3 steps and a yield of 13% (31% brsm) (Scheme 59).

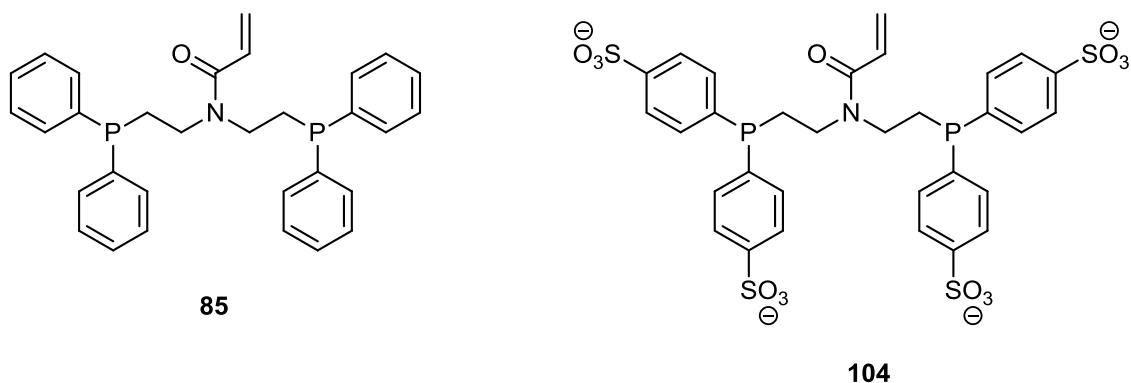


**Scheme 59:** Synthesis of the borane-protected phosphine **94**.

Phosphine **94** could be coupled to tripeptide **82** to yield phosphinopeptide **95** in 71%. Deprotection of the phosphines with diethylamine gave the free phosphine **96** with a yield of 81% (Scheme 60). However, coupling tests with the protein in the crystal and in solution did not yield the desired product.

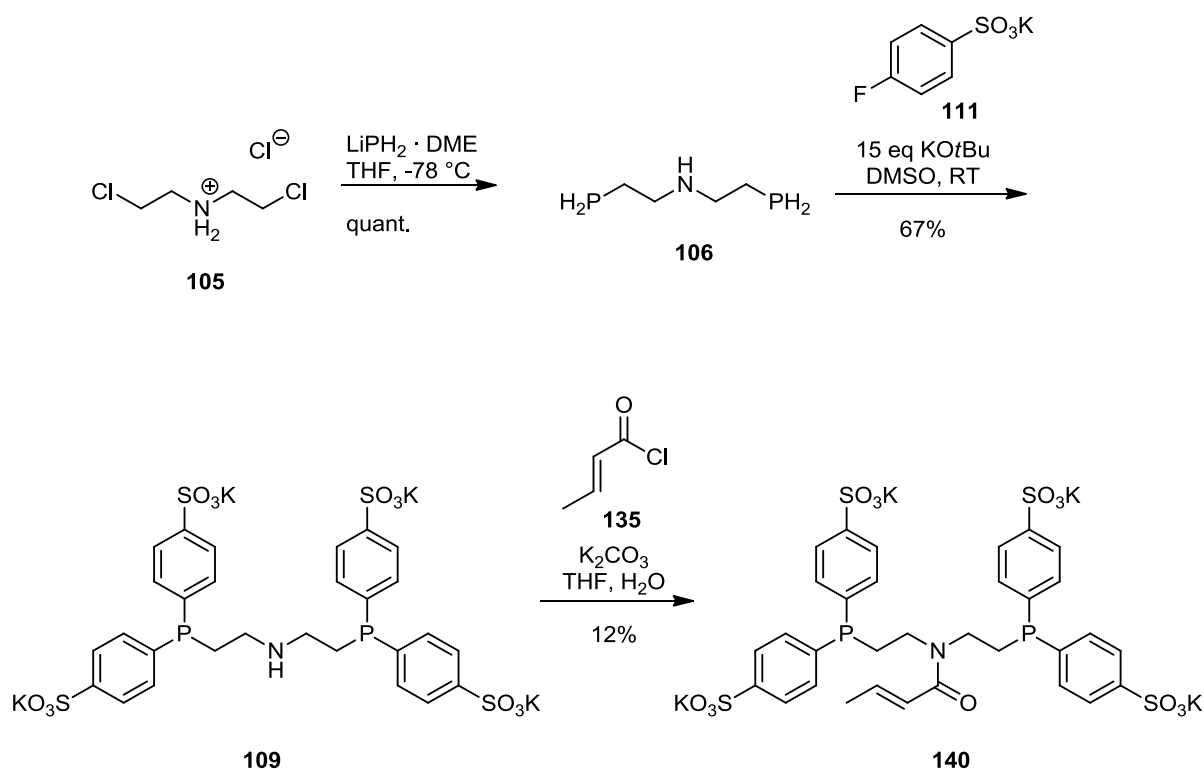


**Scheme 60:** Coupling of the borane-protected phosphine **94** to the tripeptide FmocPheCysAlaOMe with subsequent deprotection.



**Figure 35:** Whitesides' phosphine **85** and the water-soluble phosphine **104**.

Whitesides' phosphine **85** (Fig. 35) could be synthesized as described in literature. It was not possible to couple the phosphine **85** to *h*CA II-H64C neither in the crystal nor in solution. For a better solubility in water, the water-soluble phosphine **104** was developed. The synthesis of molecule **104** with the acrylamide group was not possible. The synthesis of the free phosphineamine **109** was optimized into 2 steps with a yield of 67% (Scheme 61).



**Scheme 61:** Synthesis of the water-soluble phosphine **109** and the crotonic amide **140**.

The formation of the amide bond was possible with unfunctionalized anhydrides, like acetic anhydride and propionic anhydride. The most reactive acid derivatives forming the amide bond were crotonic chloride (12% yield), *p*-methoxycinnamic chloride (16% yield) and

## Summary

*p*-chlorocinnamic chloride (27% yield). The coupling experiment of crotonic amide **140** to the *h*CA II-H64C in solution could not be evaluated furthermore due to technical problems in the mass spectrometric analysis.

In the course of this thesis, a water-soluble chelating diphosphine **140** was developed which can be used for further development of artificial metalloenzymes. Due to its water solubility it can be added to protein solutions without presence of any organic solvent as DMSO or acetonitrile. It can be subject of future studies whether the reactivity of the crotonic amide is sufficient to react with a cysteine within a protein.

## ***8 Experimenteller Teil***

### **8.1 Allgemeine Bedingungen**

#### **8.1.1 Lösungsmittel und Reagenzien**

Alle eingesetzten Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer von höher siedenden Verunreinigungen abdestilliert. Alle Reaktionen bei tiefen Temperaturen bzw. mit hydrolyse- oder sauerstoffempfindlichen Substanzen wurden in ausgeheizten Apparaturen unter Argonatmosphäre durchgeführt. Es wurde eine Wechselhahnanlage mit einer Drehschiebervakuumpumpe (*TRIVAC*, Typ: *D8B*, 0.5 mbar Enddruck) verwendet. Spritzen und Kanülen wurden vor Gebrauch mit Argon gespült. Alle kommerziell erhältlichen Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, ohne weitere Reinigung verwendet.

**Acetonitril:** In HPLC-grade Qualität gekauft und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

**Dichlormethan:** Erhitzt unter Rückfluss mit Calciumhydrid und anschließend destilliert unter Argon.

***N,N*-Dimethylformamid:** In HPLC-grade Qualität gekauft und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

**[1,4]-Dioxan:** Erhitzt unter Rückfluss mit Natrium und anschließend destilliert unter Argon.

**Tetrahydrofuran:** Vorgetrocknet über Kaliumhydroxid. Erhitzt unter Rückfluss mit Natrium und anschließend destilliert unter Argon. Verwendung von Benzophenon als Feuchtigkeits- und Sauerstoffindikator.

**Triethylamin:** Erhitzt unter Rückfluss mit Calciumhydrid und anschließend destilliert unter Argon.

**Wasser (für sauerstoffempfindliche Reaktionen):** Entionisiertes Wasser drei Mal in Flüssigstickstoff eingefroren und unter Vakuum aufgetaut.

### 8.1.2 Puffer und Lösungen für die Proteinexpression

**Ampicillin-Lösung (amp):** 2.80 g Ampicilin in 28 mL Wasser lösen und steril filtrieren.

**Chloramphenicol-Lösung (cam):** 476 mg in 14 mL Ethanol lösen und steril filtrieren.

**IPTG-Lösung:** 3.34 g IPTG in 14 mL Wasser lösen und steril filtrieren.

**PBS-Puffer:** 8.11 g NaCl, 201 mg KCl, 1.42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 245 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 L Wasser lösen, einen pH-Wert von 7.8 einstellen und steril filtrieren.

**Elutionspuffer:** 3.03 g Tris-HCl und 1.54 g reduziertes Glutathion in 500 mL Wasser lösen, einen pH-Wert von 8.0 einstellen und steril filtrieren.

**Cleavagepuffer:** 287 g Guanidin-HCl in 500 mL Wasser lösen und steril filtrieren.

**LB-Medium:** 10 g NaCl, 10 g Pepton aus Casein und 5 g Hefe in 1 L Wasser rühren und autoklavieren.

**Lysepuffer:** Eine Protease-Inhibitortablette (*Complete<sup>TM</sup>*) und 100 mg Lysozym in 150 mL PBS-Puffer lösen.

### 8.1.3 Chromatographie

**Dünnschichtchromatographie (TLC):** Zur Reaktionskontrolle wurden C-Fertigplatten (Kieselgel 60 auf Glas mit Fluoreszenzindikator F<sub>254</sub>) der Firma *Merck* verwendet. Die erhaltenen Chromatogramme wurden durch Fluoreszenzauslöschung mit einer UV-Lampe ( $\lambda = 254$  nm) und durch Anfärben mit den folgenden Tauchlösungen ausgewertet.

*Kaliumpermanganat-Tauchlösung:* 3.00 g Kaliumpermanganat, 20.0 g Natriumhydrogencarbonat, 5 mL 5%ige wässrige Natriumhydroxidlösung, 240 mL Wasser.

*Cer(IV)sulfat/Molybdato-phosphorsäure-Tauchlösung:* 5 g Cer(IV)sulfat, 12.5 g Molybdato-phosphorsäure, 40 mL konzentrierte Schwefelsäure, 460 mL Wasser.

*Ninhydrin-Tauchlösung:* 0.3% Ninhydrin in *n*-Butanol.

**Flashchromatographie:** Präparative Flashchromatographie (FC) wurde an Kieselgel 60 der Firma *Merck* (Korngröße 40-63  $\mu$ m, 230-400 mesh) unter Überdruck durchgeführt.



Kieselgelmenge, Säulengröße und Fraktionsgröße wurden in Anlehnung an die Empfehlung von *Still*<sup>[64]</sup> gewählt.

### 8.1.4 Physikalische Daten

**Kernresonanzspektroskopie:** NMR-Spektren wurden an den NMR-Spektrometern *DPX 250*, *ARX 300*, *AV 300*, *DRX 400*, *DRX 500* der Firma *Bruker* bei Raumtemperatur gemessen. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in ppm angegeben, die Kopplungskonstanten in Hz. Als interner Standard der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren dienten die Restprotonen des Lösungsmittels ( $\text{CDCl}_3$ :  $\delta = 7.26$  ppm,  $\text{DMSO-}d_6$ :  $\delta = 2.50$  ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ :  $\delta = 4.79$  ppm,  $\text{C}_6\text{D}_6$ :  $\delta = 7.16$  ppm).  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden breitbandenkoppelt aufgenommen und auf das Lösungsmittel kalibriert ( $\text{CDCl}_3$ :  $\delta = 77.16$  ppm,  $\text{DMSO-}d_6$ :  $\delta = 39.52$  ppm,  $\text{C}_6\text{D}_6$ :  $\delta = 128.06$  ppm,  $\text{DMSO in D}_2\text{O}$ :  $\delta = 39.39$  ppm).  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren wurden mit einem Kalibrationsröhrchen mit konzentrierter Phosphorsäure als interner Standard gemessen und auf das daraus resultierende Signal kalibriert ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ :  $\delta = 0$  ppm).  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren wurden mit einem Kalibrationsröhrchen mit Trifluortoluol als interner Standard gemessen und auf das daraus resultierende Signal kalibriert ( $\text{F}_3\text{CC}_6\text{H}_5$ :  $\delta = -63.72$  ppm). Eine Zuordnung der Signale erfolgte mittels 2D-NMR-Spektroskopie (COSY, HMBC). Die Multiplizitäten von aufgelösten Multipletts wurde wie folgt angegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, br = breit). Die Kopplungskonstanten wurden aus den  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Spektren abgelesen. Nicht aufgelöste Multipletts wurden als Verschiebungsbereich angegeben.

**Infrarotspektroskopie:** Infrarotspektren wurden mit einem *IFS 200* der Firma *Bruker* aufgenommen. Die Lage der Absorptionsbanden ist in Wellenzahlen ( $\text{cm}^{-1}$ ) angegeben. Die Intensität der Banden wurden durch die folgenden Abkürzungen beschrieben: breit (br), stark (s), mittel (m) und schwach (w).

**Massenspektroskopie:** Massenspektren wurden von der Routineanalytikabteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg aufgenommen. Die Messungen erfolgten mit einem *LTQ-FT* (HR-ESI) der Firma *Thermo Fischer Scientific*, einem *QStar Pulsar i* (HR-ESI) der Firma *Applied Biosystems*, sowie einem *TSQ 700* (ESI) und *MAT 95* (HR-ESI) der Firma *Finnigan*. Die Ionenmassen  $m/z$  wurden in u angegeben.

**Einkristall-Röntgenstrukturanalyse (Kleinmolekül):** Einkristall-Röntgendiffraktogramme von Kleinmolekülen wurden in der Zentralen Abteilung für Kristallstrukturanalyse des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg von M. Marsch und K. Harms an einem *IPDS2* Diffraktometer der Firma *Stoe* aufgenommen. Die Analyse der Reflexdaten wurde von K. Harms mit dem Programmpaket *Shelxl-97* durchgeführt.

**Einkristall-Röntgenstrukturanalyse (Protein):** Protein-Röntgenkristallstrukturanalysen wurden an den BESSY-PSF Beamlines 14.1 und 14.2 in Berlin aufgenommen. Es wurden Cryo-Bedingungen (100 K) und ein *MAR CCD 165 mm* oder *MAR CCD 225 mm* zur Datensammlung genutzt. Die Datenprozession und das Scaling wurden mit dem *HKL2000* Paket durchgeführt. Die Strukturbestimmung wurde mit Hilfe einer in-house CA II-H64C Struktur mittels Rigid Body Refinement mit dem *CNS Programm* Paket<sup>[65]</sup> durchgeführt. Für das anschließende Refinement wurden *Shelxl*<sup>[66]</sup> und *Coot*<sup>[67]</sup> genutzt. Die letzte Validierung des Modells wurde mit *Procheck*<sup>[68]</sup> durchgeführt.

**Drehwerte:** Drehwerte wurden mit einem *Perkin Elmer 241* Polarimeter gemessen. Es wurden getrocknete Lösungsmittel verwendet. Die Drehwerte  $[\alpha]$  sind in  $[\text{mL}(\text{mg} \cdot \text{dm})^{-1}]$  und die Konzentrationen  $c$  in  $[\text{10 mg} \cdot \text{mL}^{-1}]$  angegeben.

**Schmelzpunkte:** Schmelzpunkte wurden mit einem *Stuart SMP10* Heizmikroskop in einer einseitig offenen Kapillare bestimmt und nicht korrigiert.

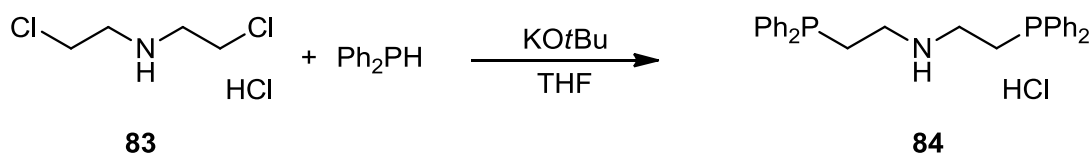
**Molmassen/Dichten:** Die Angabe der Molmassen erfolgt in  $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$  in eckigen Klammern. Die Dichte  $\rho$  von Flüssigkeiten ist, mit einem Semikolon abgetrennt, in  $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  angegeben.

**Proteinkonzentrationsbestimmung:** Die Proteinkonzentrationen wurden UV-spektroskopisch mit einem UV-Vis-Spektrometer *Smart Spec 3000* der Firma *BioRad* bestimmt. Zur Nullwertbestimmung wurde die zugehörige Pufferlösung genutzt.

## 8.2 Versuchsbeschreibungen

## 8.2.1 Phosphinsynthese

*N,N*-Bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine hydrochloride (**84**)<sup>[17]</sup>



diphenylphosphine [186.19; 1.07]	2.00 eq	49.1 mmol	8.6 mL
KOtBu [112.21]	3.10 eq	76.6 mmol	8.59 g
bis-(2-chloroethyl)amine hydrochloride [178.49]	1.00 eq	24.5 mmol	4.37 g

To a suspension of KOtBu (8.59 g, 76.6 mmol) in 150 mL THF was added dropwise diphenylphosphine (8.6 mL, 49.1 mmol). The solution was stirred for 10 min at rt and bis-(2-chloroethyl)amine hydrochloride (4.37 g, 24.5 mmol) was added. The reaction was refluxed for 15 h and 200 mL *n*-hexane were added. The organic layer was washed in succession with NaOH (100 mL, 10wt%) and brine (100 mL). The organic layer was filtered and stirred vigorously with 250 mL 2 M HCl. The precipitate was filtered off and dried in high vacuum to give *N,N*-bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine hydrochloride (6.27 g, 13.1 mmol, 54%) as colourless solid. The analytical data was in agreement with the reported values.<sup>[17]</sup>

mp: 152 °C (H<sub>2</sub>O / *n*-hexane / THF).

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 2.67-2.83 (m, 4H, PCH<sub>2</sub>), 2.86-3.06 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>), 7.27-7.38 (m, 12H, CH<sub>ar,m+p</sub>), 7.40-7.54 (m, 8H, CH<sub>ar,o</sub>), 10.22 (bs, 2H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>).

## Experimenteller Teil

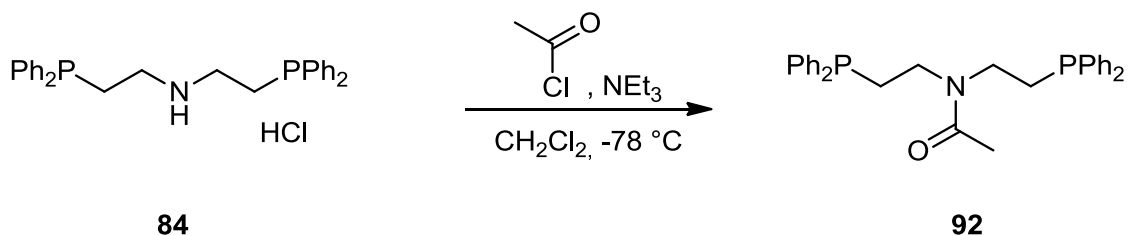
$^{13}\text{C}$ -NMR: (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 23.8 (d,  $J$  = 13.3 Hz, 2C,  $\text{PCH}_2$ ), 44.4 (d,  $J$  = 26.0 Hz, 2C,  $\text{NCH}_2$ ), 129.0 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 8C,  $\text{CH}_{\text{ar},m}$ ), 129.6 (4C,  $\text{CH}_{\text{ar},p}$ ), 132.8 (d,  $J$  = 19.1 Hz, 8C,  $\text{CH}_{\text{ar},o}$ ), 135.4 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 4C,  $\text{C}_{\text{ar},q}$ ).

$^{31}\text{P}$ -NMR: (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = -20.8.

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{NP}_2$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 442.1848; found: 442.1849.

IR: (neat)  $\tilde{\nu}$  = 3392 (br, w), 3042 (w), 2914 (w), 2710 (m), 2562 (m), 2399 (w), 1559 (w), 1456 (m), 1430 (m), 1309 (w), 1235 (w), 1178 (w), 1121 (w), 1092 (m), 1068 (m), 1042 (m), 995 (m), 917 (w), 859 (w), 784 (w), 743 (s), 691 (s), 548 (m), 501 (s), 417 (m).

### *N,N*-Bis(2-(diphenylphosphino)ethyl)acetamide (**92**)



<i>N,N</i> -bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine hydrochloride [477.95]	1.00 eq	0.21 mmol	100 mg
acetylchloride [90.51; 1.114]	2.00 eq	0.42 mmol	30 $\mu\text{L}$
$\text{NEt}_3$ [101.19; 0.728]	7.50 eq	1.58 mmol	0.2 mL

To a solution of *N,N*-bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine hydrochloride (100 mg, 0.21 mmol) in 1.2 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added  $\text{NEt}_3$  (0.2 mL, 1.58 mmol). The solution was cooled to  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  and acetyl chloride (30  $\mu\text{L}$ , 0.42 mmol) in 0.8 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added slowly. The

## Experimenteller Teil

reaction mixture was warmed up to room temperature, stirred for 2 h and poured into water (3 mL). The aqueous layer was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 3 mL) and the combined organic layers were washed with brine (10 mL) and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvents were removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica (5 g, *n*-pentane / ethyl acetate 1:1) to give *N,N*-bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)acetamide (100 mg, 207  $\mu\text{mol}$ , 99%) as colourless oil.

TLC:  $R_f = 0.44$  (*n*-pentane / ethyl acetate 1:1).

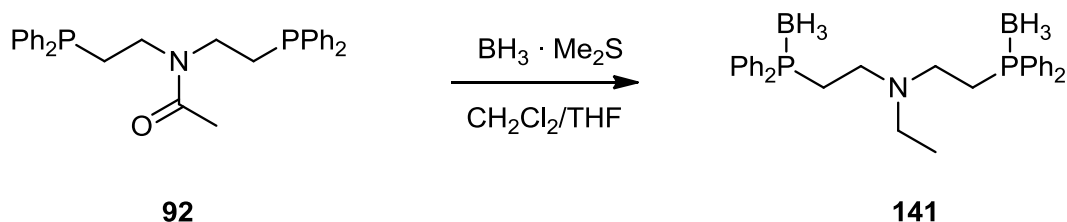
$^1\text{H}$ -NMR: (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.80$  (s, 3H, Me), 2.15-2.24 (m, 2H,  $\text{PCH}_2$ ), 2.26-2.35 (m, 2H,  $\text{PCH}_2$ ), 3.19-3.29 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.35-3.46 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 7.28-7.47 (m, 20H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR: (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 21.5$  (s, Me), 26.7 (d,  $J = 13.3$  Hz,  $\text{PCH}_2$ ), 28.2 (d,  $J = 15.6$  Hz,  $\text{PCH}_2$ ), 43.6 (d,  $J = 23.7$  Hz,  $\text{NCH}_2$ ), 46.4 (d,  $J = 26.6$  Hz,  $\text{NCH}_2$ ), 128.6 (d,  $J = 6.9$  Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar},m}$ ), 128.9 (d,  $J = 6.9$  Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar},m}$ ), 128.8 (s, 2C,  $\text{CH}_{\text{ar},p}$ ), 129.2 (s, 2C,  $\text{CH}_{\text{ar},p}$ ), 132.8 (d,  $J = 19.1$  Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar},o}$ ), 132.8 (d,  $J = 19.1$  Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar},o}$ ), 137.4 (d,  $J = 11.0$  Hz, 2C,  $\text{C}_{\text{ar},q}$ ), 138.1 (d,  $J = 12.1$  Hz, 2C,  $\text{C}_{\text{ar},q}$ ), 170.1 (CO).

$^{31}\text{P}$ -NMR: (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = -19.9, -21.1$ .

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{NNaOP}_2$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ : 506.1773; found: 506.1777.

IR: (neat)  $\tilde{\nu} = 3054$  (w), 3010 (w), 2929 (w), 1967 (w), 1887 (w), 1642 (s), 1586 (w), 1478 (m), 1430 (s), 1360 (m), 1290 (m), 1246 (w), 1195 (m), 1130 (w), 1096 (w), 1062 (w), 1224 (w), 937 (w), 842 (w), 782 (w), 742 (s), 697 (s), 607 (w), 508 (m), 480 (m), 426 (w).

*N,N*-Bis(2-(diphenylphosphino)ethyl)ethanamine borane (**141**)

*N,N*-bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)acetamide [483.52]      1.00 eq    0.17 mmol      80 mg

$\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$  in THF [2 M]      20.0 eq    3.30 mmol    1.65 mL

To a solution of *N,N*-bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)acetamide (80 mg, 0.17 mmol) in 0.5 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  were added 1.65 mL  $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$  in THF (2 M, 3.30 mmol) within 10 min. The solution was stirred over night at room temperature and 0.5 mL sat. aq.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution was added very carefully. The reaction mixture was stirred for 1 h, poured into water (5 mL) and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 5 mL). The combined organic layers were washed with sat. aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (5 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$ , and the solvents were removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica (7 g,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) to give *N,N*-bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)ethanamine borane (37 mg, 0.07 mmol, 45%) as colourless resin.

TLC:  $R_f = 0.48$  (*n*-pentane / ethyl acetate 1:1).

$^1\text{H-NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 0.30$ -1.98 (bs, 6H,  $\text{BH}_3$ ), 1.07 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.47-2.65 (m, 4H,  $\text{PCH}_2$ ), 2.71-2.99 (m, 4H,  $\text{PCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.83 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 7.35-7.57 (m, 12H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7.61-7.82 (m, 8H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ).

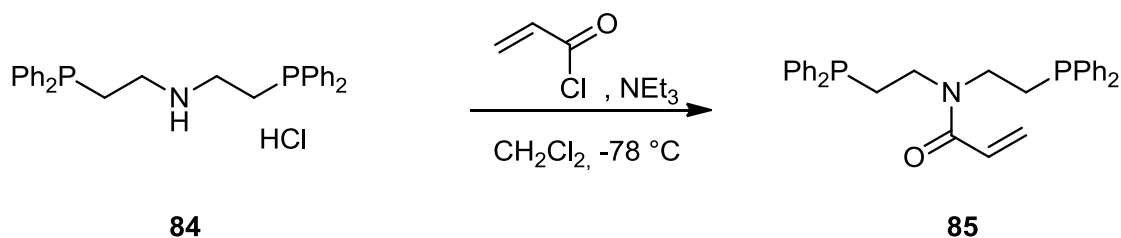
$^{13}\text{C-NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 8.34$  ( $\text{CH}_3$ ), 20.26 (d,  $J = 37.0$  Hz, 2C,  $\text{PCH}_2$ ), 52.49 ( $\text{NCH}_2$ ), 52.8 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2C,  $\text{PCH}_2\text{CH}_2$ ), 128.0 (d,  $J = 56.0$  Hz, 2C,  $\text{CH}_{\text{ar,q}}$ ), 128.1 (d,  $J = 55.5$  Hz, 2C,  $\text{CH}_{\text{ar,q}}$ ), 129.2 (d,  $J = 10.4$  Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar,m}}$ ), 129.3 (d,  $J = 10.4$  Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar,m}}$ ), 131.9 (d,  $J = 1.7$  Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar,p}}$ ), 132.2 (d,  $J = 9.8$  Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar,o}}$ ), 132.2 (d,  $J = 9.8$  Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar,o}}$ ).

$^{31}\text{P}$ -NMR: (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = -14.4$ .

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{NP}_2$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 470.2161; found: 470.2159.

IR: (neat)  $\tilde{\nu} = 3056$  (w), 2965 (w), 2923 (w), 2818 (w), 2376 (s), 2340 (m), 2252 (w), 1483 (m), 1465 (w), 1436 (s), 1411 (w), 1384 (w), 1334 (w), 1310 (w), 1186 (w), 1132 (m), 1108 (s), 1060 (s), 1028 (m), 999 (m), 972 (w), 808 (w), 735 (s), 692 (s), 620 (w), 596 (m), 501 (m), 473 (m), 437 (w).

*N,N*-Bis(2-(diphenylphosphino)ethyl)acrylamide (**85**)<sup>[17]</sup>



<i>N,N</i> -bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine hydrochloride [477.95]	1.00 eq	0.21 mmol	100 mg
acryloyl chloride [90.51; 1.114]	1.00 eq	0.21 mmol	17.0 $\mu\text{L}$
$\text{NEt}_3$ [101.19; 0.728]	2.10 eq	0.43 mmol	0.06 mL

To a solution of *N,N*-bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine hydrochloride (100 mg, 0.21 mmol) in 3 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added  $\text{NEt}_3$  (0.06 mL, 0.43 mmol). The solution was cooled to  $-78^\circ\text{C}$  and acryloyl chloride (17  $\mu\text{L}$ , 0.21 mmol) was added slowly. The reaction mixture was warmed up to room temperature, stirred for 3 h and poured into 2 M HCl (6 mL). The organic layer was washed with 2 M HCl (2 x 6 mL), water (6 mL) and brine (5 mL), and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvents were removed under reduced pressure to give the crude product (94 mg). The crude product was purified by flash chromatography on silica (9 g, *n*-pentane / ethyl acetate 1:1) to give *N,N*-bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)acrylamide

## Experimenteller Teil

(33 mg, 67  $\mu$ mol, 32%) as colourless oil. The analytical data was in agreement with the reported values.<sup>[17]</sup>

TLC:  $R_f$  = 0.55 (*n*-pentane / ethyl acetate 1:1).

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 2.18-2.29 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>), 2.29-2.38 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>), 3.27-3.39 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.41-3.53 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 5.53 (dd,  $J$  = 10.3, 2.2 Hz, 1H,  $H_aH_bC_{olef}$ ), 6.12 (dd,  $J$  = 16.6, 10.2 Hz, 1H, HC<sub>olef</sub>), 6.28 (dd,  $J$  = 16.6, 2.3 Hz, 1H,  $H_aH_bC_{olef}$ ), 7.20-7.53 (m, 20H, H<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 26.7 (d,  $J$  = 14.5 Hz, PCH<sub>2</sub>), 28.9 (d,  $J$  = 15.0 Hz, PCH<sub>2</sub>), 44.6 (d,  $J$  = 24.3 Hz, NCH<sub>2</sub>), 45.8 (d,  $J$  = 26.6 Hz, NCH<sub>2</sub>), 127.6 (HC<sub>olef</sub>), 128.1 (H<sub>2</sub>C<sub>olef</sub>), 128.7 (d,  $J$  = 6.4, 4C, CH<sub>ar,m</sub>), 128.8 (d,  $J$  = 6.4, 4C, CH<sub>ar,m</sub>), 128.8 (2C, CH<sub>ar,p</sub>), 129.2 (2C, CH<sub>ar,p</sub>), 132.8 (d,  $J$  = 18.5 Hz, 8C, CH<sub>ar,o</sub>), 137.3 (d,  $J$  = 12.1 Hz, 2C, C<sub>ar,q</sub>), 138.0 (d,  $J$  = 12.1 Hz, 2C, C<sub>ar,q</sub>), 166.0 (CO).

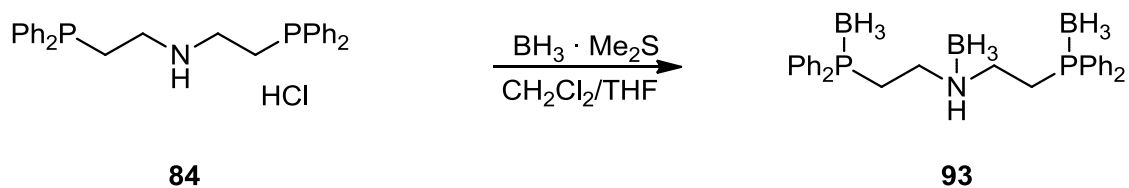
<sup>31</sup>P-NMR: (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = -19.8, -21.4.

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>NOP<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 496.1954; found: 496.1946.

IR: (neat)  $\tilde{\nu}$  = 3053 (w), 2929 (w), 1962 (w), 1890 (w), 1816 (w), 1646 (s), 1612 (m), 1477 (m), 1431 (s), 1359 (w), 1311 (w), 1275 (m), 1239 (w), 1172 (m), 1129 (w), 1095 (w), 1067 (w), 1024 (w), 977 (w), 794 (w), 741 (s), 696 (s), 619 (w), 507 (m), 479 (m), 428 (w).



*N,N*-Bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine borane (**93**)



<i>N,N</i> -bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine hydrochloride [477.95]	1.00 eq	1.05 mmol	500 mg
BH <sub>3</sub> · SMe <sub>2</sub> in THF [2 M]	20.0 eq	20.0 mmol	10.0 mL

To a solution of *N,N*-bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine hydrochloride (500 mg, 1.00 mmol) in 2 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> were added 10 mL BH<sub>3</sub> · SMe<sub>2</sub> in THF (2 M, 20 mmol) within 15 min. The solution was stirred for 19 h at room temperature and 5 mL sat. aq. NH<sub>4</sub>Cl solution were added very carefully. The reaction mixture was stirred for 1 h, poured into water (50 mL) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed with sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and the solvents were removed under reduced pressure all but 10 mL. The crude product was purified by flash chromatography on silica (50 g, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to give *N,N*-bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine borane (385 mg, 0.80 mmol, 80%) as colourless solid.

TLC:  $R_f = 0.61$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

mp: 182 °C (decomposition) (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 0.31-1.94 (m, 9H, BH<sub>3</sub>), 2.57-2.83 (m, 4H, PCH<sub>2</sub>), 2.83-3.00 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>), 4.47 (bs, 1H, NH), 7.41-7.59 (m, 12H, CH<sub>ar</sub>), 7.62-7.75 (m, 8H, CH<sub>ar</sub>).

## Experimenteller Teil

(300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 0.32-1.67 (m, 9H, BH<sub>3</sub>), 2.53-2.82 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 6.33 (bs, 1H, NH), 7.46-7.81 (m, 20H, CH<sub>ar</sub>).

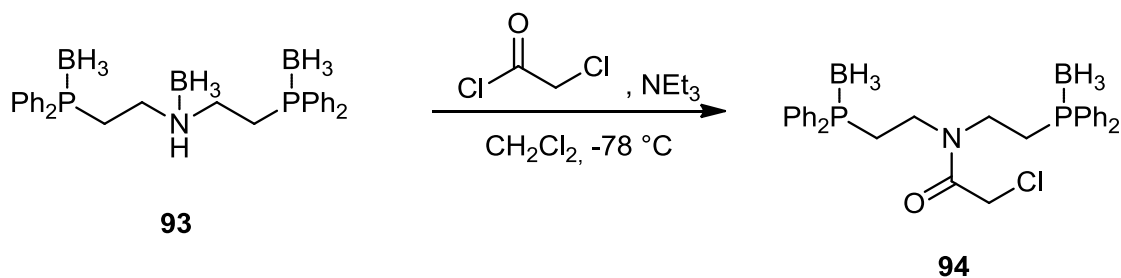
<sup>13</sup>C-NMR: (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 20.8 (d,  $J$  = 38.0 Hz, 2C, PCH<sub>2</sub>), 47.8 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 2C, NCH<sub>2</sub>), 128.1 (dd,  $J$  = 55.8, 3.0 Hz, 4C, C<sub>ar,q</sub>), 129.2 (d,  $J$  = 9.9 Hz, 8C, CH<sub>ar,m</sub>), 131.7 (d,  $J$  = 9.4 Hz, 8C, CH<sub>ar,o</sub>), 131.7 (4C, CH<sub>ar,p</sub>).

<sup>31</sup>P-NMR: (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 13.8 (bs).

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>B<sub>3</sub>NNaP<sub>2</sub> [M + Na]<sup>+</sup>: 506.2655; found: 506.2654.

IR: (neat)  $\tilde{\nu}$  = 3334 (br, w), 3207(w), 3056 (w), 2921 (w), 2853 (w), 2380 (w), 2265 (w), 1731 (w), 1644 (w), 1589 (w), 1430 (m), 1306 (w), 1276 (w), 1158 (m), 1105 (m), 1056 (s), 1024 (m), 992 (m), 920 (m), 845 (w), 782 (m), 736 (s), 691 (s), 592 (s), 546 (m), 505 (s), 466 (s), 430 (m).

### *N,N*-Bis-(2-(diphenylphosphino borane)ethyl)chloroacetamide (**94**)



## Experimenteller Teil

<i>N,N</i> -bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine borane [482.99]	1.00 eq	0.21 mmol	100 mg
chloroacetyl chloride [112.94; 1.42]	5.00 eq	1.04 mmol	82.3 $\mu$ L
NEt <sub>3</sub> [101.19; 0.728]	7.50 eq	1.55 mmol	0.22 mL

To a solution of *N,N*-bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine borane (100 mg, 0.21 mmol) in 2 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added NEt<sub>3</sub> (0.22 mL, 1.55 mmol). The mixture was cooled to -78 °C and chloroacetyl chloride (16.5  $\mu$ L, 0.21 mmol) was added. After 15 min the cooling bath was removed and the reaction mixture was allowed to warm up for 15 min. The solution was cooled down to -78 °C and chloroacetyl chloride (33  $\mu$ L, 0.41 mmol) was added. This procedure of warming up and cooling down was repeated. After adding once more chloroacetyl chloride (33  $\mu$ L, 0.41 mmol) the reaction mixture was allowed to warm up to room temperature overnight and poured into water (3 mL). The water was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 3 mL), the combined organic layers were washed with brine (10 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvents were removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography on silica (20 g, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> , *n*-pentane / ethyl acetate 1:1) to give *N,N*-bis-(2-(diphenylphosphino borane)ethyl)chloroacetamide (45 mg, 83.0  $\mu$ mol, 40%) as colourless foam and the reisolated reactant *N,N*-bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine borane (31 mg, 63.0  $\mu$ mol, 31%, 71% brsm).

TLC: R<sub>f</sub> = 0.61 (*n*-pentane / ethyl acetate 1:1).

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.27-1.89 (bs, 6H, BH<sub>3</sub>), 2.40-2.63 (m, 4H, PCH<sub>2</sub>), 3.36-3.58 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>), 3.94 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 7.37-7.55 (m, 12H, H<sub>ar</sub>), 7.63-7.78 (m, 8H, H<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 23.6 (d, *J* = 34.7 Hz, 1C, PCH<sub>2</sub>), 25.8 (d, *J* = 33.5 Hz, 1C, PCH<sub>2</sub>), 41.2 (s, 1C, CH<sub>2</sub>Cl), 42.2 (d, *J* = 5.8 Hz, 1C, NCH<sub>2</sub>), 43.9 (d, *J* = 6.9 Hz, 1C, NCH<sub>2</sub>), 127.8 (d, *J* = 51.4 Hz, 2C, C<sub>ar,q</sub>), 128.5 (d,

## Experimenteller Teil

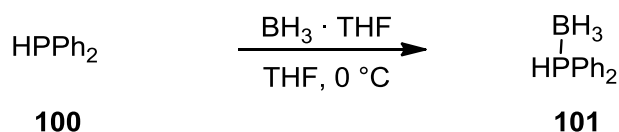
$J = 51.4$  Hz, 2C, C<sub>ar,q</sub>), 129.2 (d,  $J = 9.8$  Hz, 4C, CH<sub>ar,m</sub>), 129.4 (d,  $J = 10.4$  Hz, 4C, CH<sub>ar,m</sub>), 131.7 (d,  $J = 2.3$  Hz, 2C, CH<sub>ar,p</sub>), 132.0 (d,  $J = 2.3$  Hz, 2C, CH<sub>ar,p</sub>), 132.2 (d,  $J = 9.2$  Hz, 4C, CH<sub>ar,o</sub>), 132.2 (d,  $J = 9.8$  Hz, 4C, CH<sub>ar,o</sub>), 166.7 (CO).

<sup>31</sup>P-NMR: (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 12.7$  (bs).

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>B<sub>2</sub>ClNNaOP<sub>2</sub> [M + Na]<sup>+</sup>: 568.2043; found: 568.2040.

IR: (neat)  $\tilde{\nu} = 3057$  (w), 2950 (w), 2379 (m), 2248 (w), 1655 (s), 1480 (w), 1459 (w), 1434 (m), 1366 (w), 1310 (w), 1268 (w), 1218 (w), 1168 (w), 1134 (m), 1108 (m), 1064 (s), 1022 (w), 1000 (w), 910 (m), 803 (w), 733 (s), 696 (s), 596 (m), 496 (m), 476 (m), 437 (w).

### Diphenylphosphine borane (**101**)<sup>[46]</sup>



diphenylphosphine [186.19; 1.07]	1.00 eq	11.5 mmol	2.0 mL
BH <sub>3</sub> · THF in THF [1 M]	2.40 eq	27.6 mmol	27.6 mL

## Experimenteller Teil

To a solution of  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$  in THF (28 mL, 27.6 mmol, 1 M) at 0 °C was added diphenylphosphine (2 mL, 11.5 mmol) within 20 min. The solution was warmed up to room temperature and stirred overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography on silica (40 g,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) to give diphenylphosphine borane (2.2 g, 11.0 mmol, 96%) as colourless oil. The analytical data was in agreement with the reported values.<sup>[46]</sup>

TLC:  $R_f = 0.21$  (*n*-pentane / ethyl acetate 20:1).

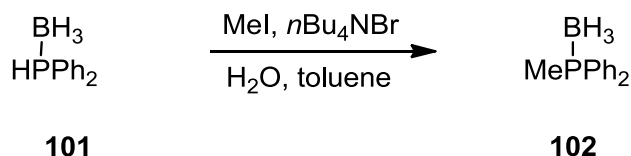
$^1\text{H}$ -NMR: (300 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta = 1.94$  (bq,  $J = 98.8$  Hz, 3H,  $\text{BH}_3$ ), 5.84 (dq,  $J = 378$  Hz, 7.1 Hz, 1H, PH), 6.84-7.11 (m, 6H,  $\text{H}_{\text{ar},m+p}$ ), 7.31-7.60 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{ar},o}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR: (75 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta = 127.2$  (d,  $J = 56.1$  Hz, 2C,  $\text{C}_{\text{ar},q}$ ), 129.1 (d,  $J = 10.4$  Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar},m}$ ), 131.5 (d,  $J = 2.3$  Hz, 2C,  $\text{CH}_{\text{ar},p}$ ), 133.2 (d,  $J = 9.8$  Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar},o}$ ).

$^{31}\text{P}$ -NMR: (121 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta = 2.0$  (bd,  $J = 52.7$  Hz).

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{BNaP}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ : 223.0821; found: 223.0817.

IR: (neat)  $\tilde{\nu} = 3057$  (w), 2384 (br, s), 2344 (m), 2253 (w), 1970 (w), 1894 (w), 1815 (w), 1589 (w), 1574 (w), 1483 (m), 1437 (s), 1386 (w), 1331 (w), 1311 (w), 1184 (w), 1133 (m), 1108 (m), 1056 (s), 1027 (m), 1000 (w), 901 (s), 850 (w), 734 (s), 689 (s), 618 (w), 582 (m), 493 (m), 450 (m), 425 (s).

Diphenylmethylphosphine borane (**102**)<sup>[47]</sup>

diphenylphosphine borane [200.02]	1.00 eq	2.50 mmol	500 mg
<i>n</i> Bu <sub>4</sub> NBr [322.37]	0.10 eq	0.25 mmol	80.6 mg
iodomethane [141.94; 2.279]	1.00 eq	2.50 mmol	0.16 mL
KOH in H <sub>2</sub> O (30wt%)			12.5 mL

To a solution of diphenylphosphine borane (500 mg, 2.50 mmol) in toluene (12.5 mL) was added KOH in H<sub>2</sub>O (12.5 mL, 30wt%), tetra-*n*-butylammoniumbromide (80.6 mg, 0.25 mmol) and iodomethane (0.16 mL 2.50 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 3 h and poured into diethylether (15 mL). The organic layer was washed in succession with water (20 mL) and brine (20 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica (50 g, *n*-pentane / ethyl acetate 100:3) to give diphenylmethylphosphine borane (451 mg, 2.10 mmol, 84%) as colourless oil. The analytical data was in agreement with the reported values.<sup>[47]</sup>

TLC:  $R_f = 0.16$  (*n*-pentane / ethyl acetate 20:1).

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 1.03$  (bq,  $J = 93.9$  Hz, 3H, BH<sub>3</sub>), 1.87 (d,  $J = 10.2$  Hz, 3H, Me), 7.35-7.56 (m, 6H, H<sub>ar,m+p</sub>), 7.58-7.77 (m, 4H, H<sub>ar,o</sub>).

## Experimenteller Teil

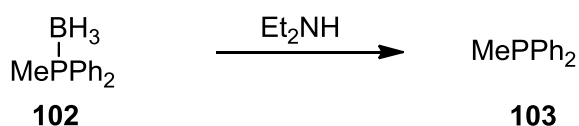
$^{13}\text{C}$ -NMR: (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 12.0 (d,  $J$  = 40.2 Hz, Me), 128.9 (d,  $J$  = 9.9 Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar},m}$ ), 130.6 (d,  $J$  = 56.7 Hz, 2C,  $\text{C}_{\text{ar},q}$ ), 131.2 (d,  $J$  = 2.8 Hz, 2C,  $\text{CH}_{\text{ar},p}$ ), 131.8 (d,  $J$  = 9.9 Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar},o}$ ).

$^{31}\text{P}$ -NMR: (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 10.6 (bq,  $J$  = 60.6 Hz).

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{BNaP}$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^{+}$ : 237.0974; found: 237.0973.

IR: (neat)  $\tilde{\nu}$  = 3056 (w), 2921 (w), 2374 (br, s), 2338 (m), 2253 (s), 1589 (w), 1485 (w), 1436 (s), 1415 (m), 1333 (w), 1311 (w), 1293 (w), 1261 (w), 1188 (w), 1160 (w), 1135 (m), 1108 (s), 1060 (s), 1028 (m), 1000 (w), 903 (s), 890 (s), 781 (m), 734 (s), 691 (s), 619 (w), 595 (s), 495 (m), 467 (m), 430 (m).

### Diphenylmethylphosphine (**103**)



methyldiphenylphosphine borane [214.05]	1.00 eq	0.21 mmol	46 mg
$\text{Et}_2\text{NH}$ [73.14; 0.71]			1.8 mL

Diphenylmethylphosphine borane (45.8 mg, 0.21 mmol) was dissolved in diethylamine (1.8 mL). The solution was stirred overnight, the solvent was removed in high vacuum and the crude product was purified by flash chromatography on silica (5 g,

## Experimenteller Teil

*n*-pentane / ethyl acetate 20:1) to give diphenylmethylphosphine (39 mg, 0.20 mmol, 95%) as colourless oil.

TLC:  $R_f = 0.53$  (*n*-pentane / ethyl acetate 20:1).

$^1\text{H-NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.64$  (d,  $J = 3.6$  Hz, 3H, Me), 7.28-7.50 (m, 10H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 12.7$  (d,  $J = 13.8$  Hz, Me), 128.5 (s, 2C,  $\text{CH}_{\text{ar},p}$ ), 128.5 (d,  $J = 6.6$  Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar},m}$ ), 132.3 (d,  $J = 18.7$  Hz, 4C,  $\text{CH}_{\text{ar},o}$ ), 140.3 (d,  $J = 12.1$  Hz, 2C,  $\text{C}_{\text{ar},q}$ ).

$^{31}\text{P-NMR}$ : (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = -26.3$ .

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{P}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 201.0828; found: 201.0828.

IR: (neat)  $\tilde{\nu} = 3064$  (w), 2968 (w), 2905 (w), 1584 (w), 1480 (w), 1431 (m), 1307 (w), 1264 (w), 1097 (w), 1025 (w), 880 (m), 800 (w), 741 (s), 696 (s), 505 (w), 478 (w), 426 (w).



BH<sub>3</sub>-deprotection experiments using Carbon monoxide

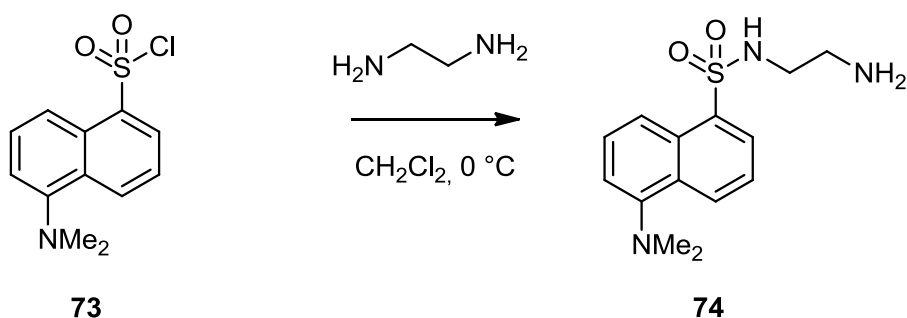
General procedure for trying to deprotect phosphine boranes using CO:

Diphenylphosphine borane (40-50 mg) was dissolved in solvent / water 5:1 (1.2 mL) in a glass inlay of an autoclave. The reaction vessel was pressurized to 30-50 bar CO and heated to 40 °C for 2 h. The reaction was controlled using <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy.

General procedure for trying to deprotect phosphine boranes using CO and Rhodium(I):

Diphenylphosphine borane (40-50 mg, 1 eq) and [Rh(cod)Cl]<sub>2</sub> (0.13 eq) were dissolved in solvent / water 5:1 (1.2 mL) in a glass inlay of an autoclave. The reaction vessel was pressurized to 30-50 bar CO and heated to 40 °C for 2 h. The reaction was controlled using <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy.

## 8.2.2 Dansylsynthese

Dansylethylenediamine (**74**)<sup>[44]</sup>

Dansylchloride **73** [250.32]

1.00 eq   0.80 mmol   200 mg

1,2-ethylenediamine [60.10; 0.90]

3.00 eq   2.40 mmol   0.15 mL

## Experimenteller Teil

A solution of 1,2-ethyldiamine (0.15 mL, 2.40 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) under argon was cooled to 0 °C and a solution of dansylchloride (200 mg, 0.80 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) was added. After 1 h the reaction mixture was warmed up to room temperature and stirred for 1 h. The solution was poured into NaOH (10 mL, 10wt%) and the aqueous layer was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography on silica (50 g,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / MeOH 10:1  $\rightarrow$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / MeOH /  $\text{NH}_3$  10:1:0.1) to give dansylamine **74** (170 mg, 0.58 mmol, 72%) as yellow foam. The analytical data was in agreement with the reported values.<sup>[44]</sup>

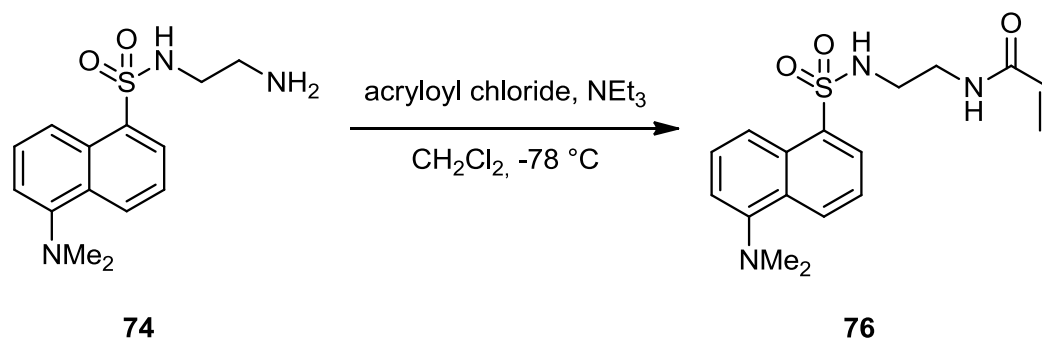
TLC:  $R_f$  = 0.21 ( $\text{CHCl}_3$  / MeOH /  $\text{NH}_3$  10:1:0.1).

$^1\text{H}$ -NMR: (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 2.73 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 2.89 (s, 6H,  $\text{NMe}_2$ ), 2.92 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 7.18 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}\text{C}(\text{CNMe}_2)$ ), 7.48-7.62 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 8.25 (dd,  $J$  = 7.3, 1.2 Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 8.30 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 8.54 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR: (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 40.9 ( $\text{NCH}_2$ ), 45.4 ( $\text{NCH}_2$ ), 45.6 (2C,  $\text{NMe}_2$ ), 115.4 ( $\text{CH}_{\text{ar}}(\text{CNMe}_2)$ ), 118.9 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 123.3 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 128.6 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 129.8 ( $\text{C}_{\text{ar,q}}$ ), 129.8 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 130.1 ( $\text{C}_{\text{ar,q}}$ ), 130.6 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 134.8 ( $\text{C}_{\text{ar,q}}\text{SO}_3\text{R}$ ), 152.2 ( $\text{C}_{\text{ar,q}}\text{NMe}_2$ ).

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : 294.1271; found: 294.1274.

IR: (neat)  $\tilde{\nu}$  = 3291 (w), 3077 (w), 2942 (w), 2867 (w), 2834 (w), 2786 (w), 1577 (m), 1456 (m), 1402 (m), 1353 (w), 1312 (s), 1232 (w), 1200 (w), 1141 (s), 1095 (m), 1068 (m), 943 (m), 834 (w), 791 (s), 736 (w), 683 (w), 624 (s), 572 (s), 540 (m), 494 (w), 446 (w).

*N*-[2-(5-*N,N*-dimethylaminonaphthyl-1-sulfonamido)ethyl] acrylamide (**76**)

dansylamine <b>74</b> [293.38]	1.00 eq	0.17 mmol	50 mg
acryloyl chloride [90.51; 1.114]	1.00 eq	0.17 mmol	14 $\mu\text{L}$
NEt <sub>3</sub> [101.19; 0.728]	2.00 eq	0.34 mmol	50 $\mu\text{L}$

To a solution of dansylamine (50 mg, 0.17 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.5 mL) was added NEt<sub>3</sub> (0.05 mL, 0.34 mmol). The solution was cooled to -78 °C and acryloyl chloride (14  $\mu\text{L}$ , 0.17 mmol) was added. The reaction mixture was warmed up to room temperature overnight and poured into HCl (3 mL, 2 M). The organic layer was washed in succession with water (3 mL) and brine (3 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography on silica (5 g, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 20:1) to give dansylacrylamide **76** (45 mg, 0.13 mmol, 76%) as yellow foam.

TLC:  $R_f$  = 0.11 (*n*-pentane / ethyl acetate 1:1).

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 2.87 (s, 6H, NMe<sub>2</sub>), 3.06 (q,  $J$  = 5.4 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.37 (q,  $J$  = 5.4 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 5.51 (dd,  $J$  = 10.3, 1.4 Hz, 1H,  $H_aH_bC_{\text{olef}}$ ), 5.90 (dd,  $J$  = 17.0, 10.2 Hz, 1H, HC<sub>olef</sub>), 6.14 (dd,  $J$  = 16.9, 1.4 Hz, 1H,  $H_aH_bC=$ ), 6.14 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 1H, NH), 6.52 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 1H, NH), 7.15 (d,

## Experimenteller Teil

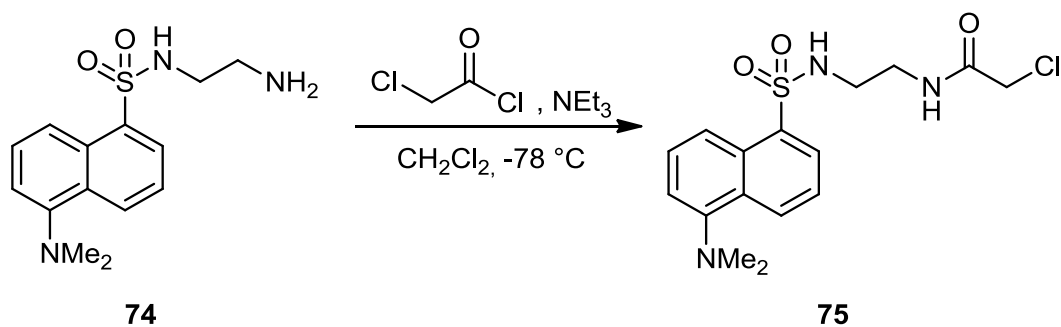
$J = 7.2$  Hz, 1H,  $H_{\text{ar}}\text{CCNMe}_2$ ), 7.49 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H,  $H_{\text{ar}}$ ), 7.52 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H,  $H_{\text{ar}}$ ), 8.20 (dd,  $J = 7.3, 1.2$  Hz, 1H,  $H_{\text{ar}}$ ), 8.28 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H,  $H_{\text{ar}}$ ), 8.52 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H,  $H_{\text{ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR: (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 39.5$  ( $\text{NCH}_2$ ), 43.1 ( $\text{NCH}_2$ ), 45.5 (2C,  $\text{NMe}_2$ ), 115.4 ( $H_{\text{ar}}\text{CCNMe}_2$ ), 118.8 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 123.3 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 126.8 ( $\text{H}_2\text{C}_{\text{olef}}$ ), 128.7 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 129.6 ( $\text{C}_{\text{ar,q}}$ ), 129.7 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 130.1 ( $\text{C}_{\text{ar,q}}$ ), 130.6 ( $\text{HC}_{\text{olef}}$ ), 130.8 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 134.4 ( $\text{C}_{\text{ar,q}}\text{SO}_2$ ), 152.2 ( $\text{C}_{\text{ar,q}}\text{NMe}_2$ ), 166.5 (CO).

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ : 370.1196; found: 370.1196.

IR: (neat)  $\tilde{\nu} = 3283$  (w), 2942 (w), 2870 (w), 2835 (w), 2787 (w), 1661 (s), 1622 (m), 1540 (m), 1454 (m), 1407 (m), 1317 (s), 1237 (m), 1201 (w), 1144 (s), 1095 (m), 977 (w), 949 (w), 912 (w), 866 (w), 792 (s), 732 (m), 683 (w), 626 (m), 571 (m), 538 (w), 498 (w), 459 (w).

### *N*-[2-(5-*N,N*-dimethylaminonaphthyl-1-sulfonamido)ethyl] chloroacetamide (75)



Dansylamine **74** [293.38]

1.00 eq 0.17 mmol 50 mg

## Experimenteller Teil

chloroacetyl chloride [112.94; 1.42]	1.00 eq	0.17 mmol	14 $\mu$ L
NEt <sub>3</sub> [101.19; 0.728]	2.00 eq	0.34 mmol	50 $\mu$ L

To a solution of dansylamine (50 mg, 0.17 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.5 mL) was added NEt<sub>3</sub> (0.05 mL, 0.34 mmol). The solution was cooled to -78 °C and chloroacetyl chloride (14  $\mu$ L, 0.17 mmol) was added. The reaction mixture was warmed up to room temperature overnight and poured into HCl (3 mL, 2 M). The organic layer was washed in succession with NaOH (3 mL, 2 M), water (3 mL) and brine (3 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography on silica (10 g, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 20:1) to give dansylchloroacetamide **75** (34 mg, 91.9  $\mu$ mol, 54%) as yellow foam.

TLC: R<sub>f</sub> = 0.36 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 20:1).

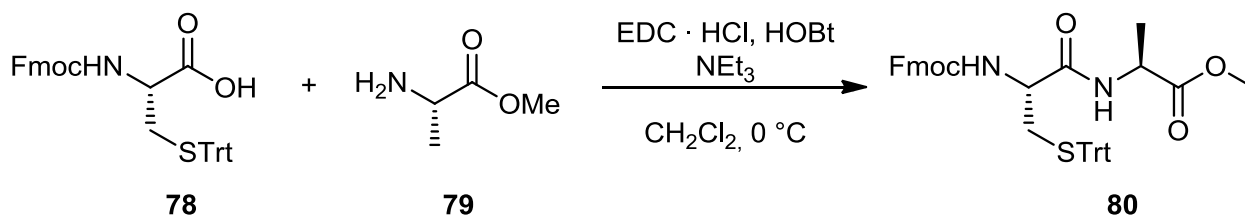
<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 2.88 (s, 6H, NMe<sub>2</sub>), 3.02-3.14 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.28-3.40 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.84 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 5.70 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 6.89 (bs, 1H, NH), 7.18 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>CCNMe<sub>2</sub>), 7.46-7.62 (m, 2H, CH<sub>ar</sub>), 8.18-8.30 (m, 2H, CH<sub>ar</sub>), 8.54 (dd, *J* = 8.5, 0.8 Hz, 1H, CH<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 39.7 (NCH<sub>2</sub>), 42.5 (CH<sub>2</sub>Cl), 43.0 (NCH<sub>2</sub>), 45.5 (2C, NMe<sub>2</sub>), 115.5 (CH<sub>ar</sub>CNMe<sub>2</sub>), 118.7 (CH<sub>ar</sub>), 123.3 (CH<sub>ar</sub>), 128.7 (CH<sub>ar</sub>), 129.6 (C<sub>ar,q</sub>), 129.8 (CH<sub>ar</sub>), 130.1 (C<sub>ar,q</sub>), 130.9 (CH<sub>ar</sub>), 134.4 (C<sub>ar,q</sub>SO<sub>2</sub>), 152.3 (C<sub>ar,q</sub>NMe<sub>2</sub>), 167.2 (CO).

HRMS: (ESI): *m/z* calcd for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>S [M + Na]<sup>+</sup>: 392.0806; found: 392.0806.

IR: (neat)  $\tilde{\nu}$  = 3297 (bw), 2944 (w), 2870 (w), 2835 (w), 2787 (w), 1660 (s), 1571 (m), 1539 (m), 1454 (m), 1407 (m), 1317 (s), 1262 (w), 1233 (w), 1201 (w), 1144 (s), 1094 (m), 943 (w), 916 (w), 791 (s), 732 (w), 683 (w), 625 (m), 571 (m), 539 (w), 499 (w), 438 (w).

## 8.2.3 Peptidsynthese

*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-trityl-L-Cysteine-L-Alanine-methylester (**80**)

Fmoc-L-Cys(Trt)-OH [585.71]	1.00 eq	3.42 mmol	2.00 g
H-L-AlaOMe · HCl [139.58]	1.00 eq	3.42 mmol	478 mg
HOBT · H <sub>2</sub> O [153.14]	1.48 eq	5.06 mmol	775 mg
EDC · HCl [191.70]	1.22 eq	4.18 mmol	802 mg
NEt <sub>3</sub> [101.19; 0.728]	3.00 eq	8.56 mmol	1.4 mL

To a solution of *N*-Fmoc-*S*-trityl-L-Cysteine (2.00 g, 3.42 mmol) in 35 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> at 0 °C were added NEt<sub>3</sub> (1.4 mL, 8.56 mmol), EDC · HCl (802 mg, 4.18 mmol), HOBT · H<sub>2</sub>O (775 mg, 5.06 mmol) and L-Alanine-methylester hydrochloride (478 mg, 3.42 mmol). The mixture was stirred overnight and poured into NaHSO<sub>4</sub> solution (40 mL, 1 M). The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 mL) and the combined organic layers were washed with sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (60 mL), which was reextracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL), and the combined organic layers were washed with water (50 mL), which was reextracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvents were removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography on silica (250 g, *n*-pentane / ethyl acetate 3:2) to give dipeptide **80** (1.40 g, 2.09 mmol, 61%) as colourless foam.

TLC:  $R_f = 0.21$  (*n*-pentane / ethyl acetate 2:1).

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 1.32$  (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H, Ala-H<sub>β</sub>), 2.58 (dd,  $J = 13.3$ , 5.2 Hz, 1H, Cys-H<sub>β</sub>), 2.71 (dd,  $J = 13.2$ , 7.7 Hz, 1H, Cys-H<sub>β</sub>), 3.67 (s, 3H, OMe), 3.73 (td,  $J = 7.7$ , 5.4 Hz, 1H, Cys-H<sub>α</sub>), 4.17 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H, Fmoc-

## Experimenteller Teil

CH), 4.35 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.45 (quin,  $J = 7.2$  Hz, 1H, Ala-H<sub>α</sub>), 5.01 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, Cys-NH), 6.31 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, Ala-NH), 7.14-7.30 (m, 11H, H<sub>ar</sub> (2 x Fmoc-H<sub>ar</sub>, 9 x Trt-H<sub>ar</sub>)), 7.35 (dd,  $J = 7.4, 3.8$  Hz, 2H, Fmoc-H<sub>ar</sub>), 7.38-7.46 (m, 6H, Trt-H<sub>ar</sub>), 7.55 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H, Fmoc-H<sub>ar</sub>), 7.73 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H, Fmoc-H<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 18.4 (Ala-C<sub>β</sub>), 34.0 (Cys-C<sub>β</sub>), 47.2 (Fmoc-CH), 48.3 (Ala-C<sub>α</sub>), 52.6 (OMe), 54.1 (Cys-C<sub>α</sub>), 67.2 (Trt-C<sub>q</sub>), 67.5 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 120.1 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 125.2 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 127.1 (3C, Trt-CH<sub>ar,p</sub>), 127.2 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 127.9 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 128.2 (6C, Trt-CH<sub>ar</sub>), 129.7 (6C, Trt-CH<sub>ar</sub>), 141.4 (2C, Fmoc-C<sub>ar,q</sub>), 143.9 (2C, Fmoc-C<sub>ar,q</sub>), 144.5 (3C, Trt-C<sub>ar,q</sub>), 156.0 (Fmoc-CO), 169.7 (CO), 172.8 (CO).

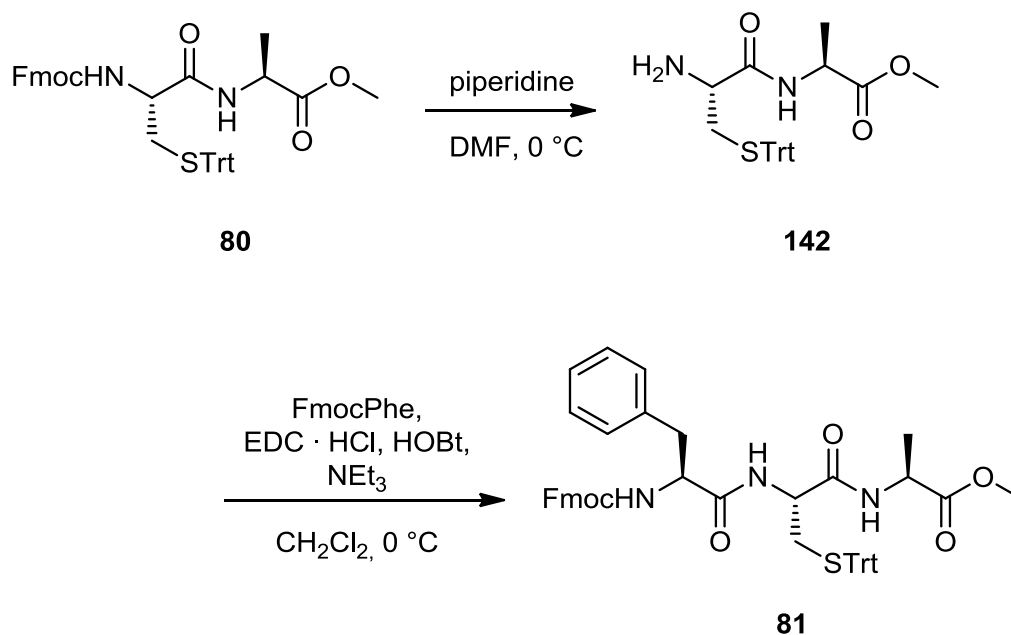
HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>41</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub>S [M + Na]<sup>+</sup>: 693.2394; found: 693.2402.

IR: (neat)  $\tilde{\nu}$  = 3301 (br, w), 3055 (w), 2947 (w), 1732 (m), 1660 (s), 1594 (w), 1519 (m), 1491 (m), 1444 (m), 1372 (w), 1315 (w), 1238 (s), 1211 (s), 1143 (m), 1038 (s), 883 (w), 848 (w), 739 (s), 698 (s), 618 (s), 542 (m), 500 (m), 424 (w).

Spec. Rotation:  $c = 21$  mg/2 mL = 1.05,  $d = 10$  cm = 1 dm, CHCl<sub>3</sub>, T = 19 °C

$[\alpha]_D = +13.5$ ,  $[\alpha]_{578} = +14.5$ ,  $[\alpha]_{546} = +16.8$ ,  $[\alpha]_{436} = +33.8$ ,  $[\alpha]_{365} = +63.7$ .

*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Phenylalanine-*S*-trityl-L-Cysteine-L-Alanine-methylester (**81**)



Fmoc-L-Cys(Trt)-L-Ala-OMe [670.82]	1.00 eq	4.47 mmol	3.00 g
piperidine [85.15; 0.862]			6.2 mL
Fmoc-L-Phe-OH [387.40]	1.00 eq	4.47 mmol	1.73 mg
HOBT · H <sub>2</sub> O [153.14]	1.50 eq	6.73 mmol	1.03 mg
EDC · HCl [191.70]	1.25 eq	5.58 mmol	1.07 mg
NEt <sub>3</sub> [101.19; 0.728]	1.50 eq	6.71 mmol	0.9 mL

To a solution of Fmoc-L-Cys(Trt)-L-Ala-OMe (3.0 g, 4.47 mmol) in 24.8 mL DMF at 0 °C was added piperidine (6.2 mL). After stirring for ten minutes the solvent was removed in high vacuum and the resulting yellow oil was washed six times with *n*-pentane (30 mL). The crude product was used without further purification for the next coupling step.

To a suspension of Fmoc-L-Phe-OH (1.73 mg, 4.47 mmol) in 35 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> at 0 °C was added NEt<sub>3</sub> (0.9 mL, 6.71 mmol), HOBT · H<sub>2</sub>O (1.03 mg, 6.73 mmol), EDC · HCl (1.07 mg, 5.58 mmol) and H-L-Cys(Trt)-L-Ala-OMe as crude product in 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The reaction mixture was warmed up to room temperature, stirred overnight and poured into NaHSO<sub>4</sub> solution (50 mL, 1 M). The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) and the combined organic layers were washed with sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (50 mL), which was reextracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL), and the combined organic layers were washed with water



## Experimenteller Teil

(50 mL), which was reextracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvents were removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography on silica (200 g, *n*-pentane / ethyl acetate 2:1 → 1:1) to give tripeptide **81** (2.12 g, 2.59 mmol, 58%) as colourless solid.

TLC:  $R_f = 0.28$  (*n*-pentane / ethyl acetate 1:1).

mp: 186 °C (*n*-pentane / ethyl acetate).

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 1.33$  (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, Ala-H<sub>β</sub>), 2.50 (dd,  $J = 13.0$ , 5.3 Hz, 1H, Cys-H<sub>β</sub>), 2.74 (dd,  $J = 12.5$ , 6.8 Hz, 1H, Cys-H<sub>β</sub>), 2.91-3.09 (m, 2H, Phe-H<sub>β</sub>), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.96-4.08 (m, 1H, Cys-H<sub>α</sub>), 4.15 (t,  $J = 6.2$  Hz, 1H, Fmoc-CH), 4.21-4.33 (m, 1H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.34-4.51 (m, 3H, Phe-H<sub>α</sub>, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Ala-H<sub>α</sub>), 5.29 (bs, 1H, Phe-NH), 6.22 (bs, 1H, Cys-NH), 6.53 (bs, 1H, Ala-NH), 7.08-7.34 (m, 16H, H<sub>ar</sub> (2 x Fmoc-H<sub>ar</sub>, 9 x Trt-H<sub>ar</sub>, 5 x Phe-H<sub>ar</sub>), 7.34-7.44 (m, 8H, H<sub>ar</sub> (2 x Fmoc-H<sub>ar</sub>, 6 x Trt-H<sub>ar</sub>)), 7.51 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, Fmoc-H<sub>ar</sub>), 7.77 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc-H<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 18.2$  (1C, Ala-C<sub>β</sub>), 33.4 (1C, Cys-C<sub>β</sub>), 38.4 (1C, Phe-C<sub>β</sub>), 47.3 (1C, Fmoc-CH), 48.4 (1C, Ala-C<sub>α</sub>), 52.4 (1C, Cys-C<sub>α</sub>), 52.5 (1C, OMe), 56.1 (1C, Phe-C<sub>α</sub>), 67.2 and 67.3 (2C, Fmoc-CH<sub>2</sub> and Trt-C<sub>q</sub>), 120.1 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 125.1 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 127.0 (3C, Trt-CH<sub>ar,p</sub>), 127.2 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 127.3 (1C, Phe-CH<sub>ar,p</sub>), 127.9 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 128.2 (6C, Trt-CH<sub>ar</sub>), 128.9 (2C, Phe-CH<sub>ar</sub>), 129.4 (2C, Phe-CH<sub>ar</sub>), 129.7 (6C, Trt-CH<sub>ar</sub>), 136.1 (1C, Phe-C<sub>ar,q</sub>), 141.4 (2C, Fmoc-C<sub>ar,q</sub>), 143.8 (2C, Fmoc-C<sub>ar,q</sub>), 144.5 (3C, Trt-C<sub>ar,q</sub>), 156.0 (1C, Fmoc-CO), 169.1 (CO), 170.8 (CO), 172.8 (CO).

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>50</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>6</sub>S [M + Na]<sup>+</sup>: 840.3078; found: 840.3078.

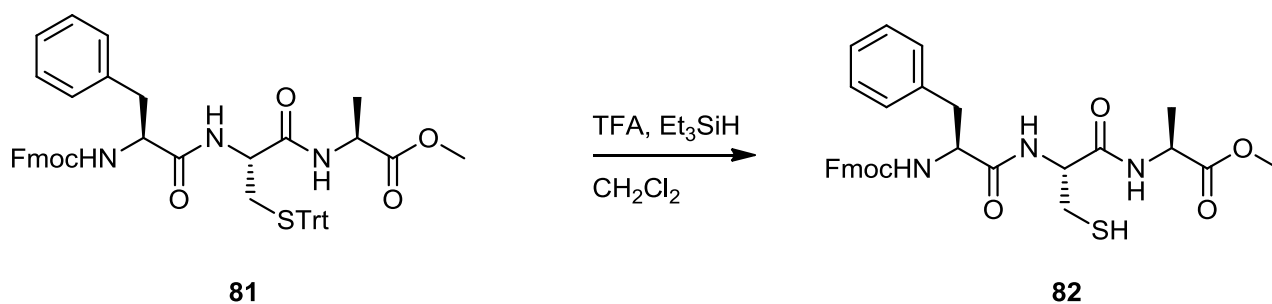
IR (neat)  $\tilde{\nu} = 3293$  (br, w), 3056 (w), 2945 (w), 1740 (w), 1708 (m), 1672 (m), 1639 (s), 1523 (m), 1491 (m), 1443 (m), 1397 (w), 1211 (m), 1148 (m), 1079 (m), 1034 (m), 883 (w), 847 (w), 738 (s), 696 (s), 618 (s), 576 (m), 502 (m), 424 (m).

## Experimenteller Teil

Spec. Rotation:  $c = 20 \text{ mg}/2 \text{ mL} = 1.0$ ,  $d = 10 \text{ cm} = 1 \text{ dm}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $T = 19^\circ \text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}} = -8.4$ ,  $[\alpha]_{578} = -8.8$ ,  $[\alpha]_{546} = -9.7$ ,  $[\alpha]_{436} = -14.4$ ,  $[\alpha]_{365} = -16.8$ .

### *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Phenylalanine-L-Cysteine-L-Alanine-methylester (**82**)



Fmoc-L-Phe-L-Cys(Trt)-L-Ala-OMe [817.99]	1.00 eq	1.80 mmol	1.47 g
Et <sub>3</sub> SiH [116.28; 0.72]	4.00 eq	7.19 mmol	1.2 mL
TFA [114.02; 1.535]			35 mL

To a solution of tripeptide **81** (1.47 g, 1.80 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (35 mL) and trifluoroacetic acid (35 mL) was added triethylsilane (1.2 mL, 7.19 mmol). The reaction mixture was stirred for 30 minutes at room temperature. The solvents were removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography on silica (150 g, *n*-pentane / ethyl acetate 1:1) to give the thiol **82** (754 mg, 1.31 mmol, 73%) as white solid.

TLC:  $R_f = 0.15$  (*n*-pentane / ethyl acetate 1:1).

mp:  $177^\circ \text{C}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.37$  (d,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ , 3H, Ala- $\text{H}_\beta$ ), 1.64 (dd,  $J = 9.8, 8.1 \text{ Hz}$ , 1H, SH), 2.62-2.75 (m, 1H, Cys- $\text{H}_\beta$ ), 2.91-3.20 (m, 3H, Cys- $\text{H}_\beta$  und Phe- $\text{H}_\beta$ ), 3.72 (s, 3H, OMe), 4.17 (t,  $J = 6.9 \text{ Hz}$ , 1H, Fmoc-CH), 4.26-4.58 (m,

## Experimenteller Teil

4H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, Phe-H<sub>α</sub>, Ala-H<sub>α</sub>), 4.59-4.72 (m, 1H, Cys-H<sub>α</sub>), 5.37 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, Phe-NH), 6.88-7.05 (m, 2H, Ala-NH und Cys-NH), 7.12-7.34 (m, 7H, H<sub>ar</sub>(4 x Fmoc-H<sub>ar</sub>, 3 x Phe-H<sub>ar</sub>), 7.39 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, Fmoc-H<sub>ar</sub>), 7.51 (dd,  $J = 7.0, 4.3$  Hz, 2H, Phe-H<sub>ar</sub>), 7.76 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H, Fmoc-H<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 18.0$  (1C, Ala-C<sub>β</sub>), 26.8 (1C, Cys-C<sub>β</sub>), 38.3 (1C, Phe-C<sub>β</sub>), 47.2 (1C, Fmoc-CH), 48.5 (1C, Ala-C<sub>α</sub>), 52.6 (1C, OMe), 54.4 (1C, Cys-C<sub>α</sub>), 56.5 (1C, Phe-C<sub>α</sub>), 67.4 (1C, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 120.2 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 125.1 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 127.2 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 127.4 (1C, Phe-CH<sub>ar</sub>), 127.9 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 129.0 (2C, Phe-CH<sub>ar</sub>), 129.4 (2C, Phe-CH<sub>ar</sub>), 136.1 (1C, Phe-C<sub>ar,q</sub>), 141.4 (2C, Fmoc-C<sub>ar,q</sub>), 143.8 (2C, Fmoc-C<sub>ar,q</sub>), 156.3 (1C, Fmoc-CO), 169.0 (CO), 171.1 (CO), 172.9 (CO).

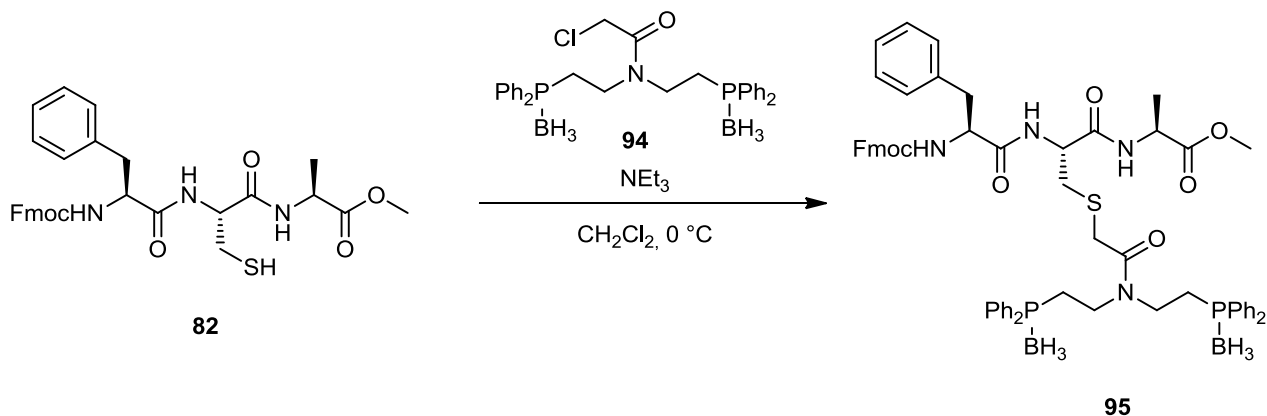
HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>6</sub>S [M + Na]<sup>+</sup>: 598.1982; found: 598.1988.

IR: (neat)  $\tilde{\nu} = 3283$  (br, m), 3060 (w), 2948 (w), 1738 (w), 1689 (m), 1638 (s), 1527 (s), 1448 (m), 1387 (w), 1324 (w), 1287 (m), 1255 (s), 1218 (s), 1145 (m), 1084 (m), 1036 (m), 935 (w), 854 (w), 737 (s), 697 (s), 563 (m), 500 (m), 465 (w), 425 (m).

Spec. Rotation:  $c = 10$  mg/1 mL = 1.0,  $d = 10$  cm = 1 dm, CHCl<sub>3</sub>,  $T = 18.5$  °C

$[\alpha]_D = -19.7$ ,  $[\alpha]_{578} = -20.1$ ,  $[\alpha]_{546} = -23.4$ ,  $[\alpha]_{436} = -43.5$ ,  $[\alpha]_{365} = -77.0$ .

*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Phenylalanine-*S*-[2'-methano-(*N,N*-bis-(2-diphenylphosphine-borane)ethyl)-amido]-L-Cysteine-L-Alanine-methylester (**95**)



tripeptide <b>82</b> [575.68]	1.00 eq	76.0 $\mu$ mol	44 mg
chloroacetamide <b>94</b> [545.64]	1.00 eq	76.0 $\mu$ mol	41 mg
NEt <sub>3</sub> [101.19; 0.728]	1.00 eq	76.0 $\mu$ mol	11 $\mu$ L

To a solution of chloroacetamide **94** (41 mg, 76.0  $\mu$ mol) in 3 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> under argon was added NEt<sub>3</sub> (11  $\mu$ L, 76.0  $\mu$ mol). After cooling the mixture to 0 °C tripeptide **82** (44 mg, 76.0  $\mu$ mol) was added as solid and the solution was stirred overnight. The reaction mixture was poured into water (5 mL). The aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 3 mL) and the combined organic layers were washed with brine (15 mL), which was reextracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). The combined organic extracts were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica (10 g, *n*-pentane / ethyl acetate 1:1  $\rightarrow$  1:2) to give tripeptide-phosphine borane **95** (59 mg, 53.9  $\mu$ mol, 71%) as colourless foam.

TLC:  $R_f$  = 0.33 (*n*-pentane / ethyl acetate 1:2).

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 0.20-1.92 (bs, 6H, BH<sub>3</sub>), 1.38 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H, Ala-H $\beta$ ), 2.38-2.70 (m, 4H, PCH<sub>2</sub>), 2.71 (dd,  $J$  = 14.5, 6.2 Hz, 1H, Cys-H $\beta$ ), 2.91 (dd,  $J$  = 14.5, 5.5 Hz, 1H, Cys-H $\beta$ ), 3.01-3.13 (m, 2H, Phe-H $\beta$ ), 3.19 (d,  $J$  = 15.5 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.30 (d,  $J$  = 15.5 Hz, 1H, SCH<sub>2</sub>), 3.30-3.53 (m, 2H,

## Experimenteller Teil

NCH<sub>2</sub>), 3.54-3.72 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.66 (s, 3H, OMe), 4.13 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H, Fmoc-CH), 4.19-4.30 (m, 1H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.31-4.64 (m, 4H, Fmoc-CH<sub>2</sub>(1H), Ala-H <sub>$\alpha$</sub> , Phe-H <sub>$\alpha$</sub> , Cys-H <sub>$\alpha$</sub> ), 5.36 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, Phe-NH), 7.07-7.32 (m, 7H, H<sub>ar</sub> (4 x Fmoc-H<sub>ar</sub>, 3 x Phe-H<sub>ar</sub>), 7.33-7.55 (m, 14H, H<sub>ar</sub> (2 x Phe-H<sub>ar</sub>, 12 x PPh-H<sub>ar</sub>), 7.38 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H, Fmoc-H<sub>ar</sub>), 7.58 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H, Cys-NH), 7.76-7.84 (m, 9H, Ala-NH, PPh-H<sub>ar</sub>), 7.74 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H, Fmoc-H<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 17.8 (Ala-C <sub>$\beta$</sub> ), 23.8 (d,  $J = 34.1$  Hz, PCH<sub>2</sub>), 25.3 (d,  $J = 34.1$  Hz, PCH<sub>2</sub>), 34.2 (SCH<sub>2</sub>), 35.8 (Cys-C <sub>$\beta$</sub> ), 38.5 (Phe-C <sub>$\beta$</sub> ), 42.2 (d,  $J = 6.4$  Hz, NCH<sub>2</sub>), 43.8 (d,  $J = 7.5$  Hz, NCH<sub>2</sub>), 47.2 (Fmoc-CH), 48.4 (Ala-C <sub>$\alpha$</sub> ), 52.4 (2C, OMe und Cys-C <sub>$\alpha$</sub> ), 56.0 (Phe-C <sub>$\alpha$</sub> ), 67.2 (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 120.1 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 125.1 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 127.2 (3C, CH<sub>ar</sub> (2 x Fmoc-CH<sub>ar</sub>, 1 x Phe-CH<sub>ar</sub>)), 127.8 (2C, Fmoc-CH<sub>ar</sub>), 127.9 (d,  $J = 52.6$  Hz, 2C, PPh<sub>2</sub>-C<sub>ar,q</sub>), 128.0 (d,  $J = 53.8$  Hz, 2C, PPh<sub>2</sub>-C<sub>ar,q</sub>), 128.7 (2C, Phe-CH<sub>ar</sub>), 129.0 (d,  $J = 9.8$  Hz, 4C, PPh<sub>2</sub>-CH<sub>ar,m</sub>), 129.2 (d,  $J = 9.8$  Hz, 4C, PPh<sub>2</sub>-CH<sub>ar,m</sub>), 129.4 (2C, Phe-CH<sub>ar</sub>), 131.9 (2C, PPh<sub>2</sub>-C<sub>ar,p</sub>), 131.6 (2C, PPh<sub>2</sub>-C<sub>ar,p</sub>), 132.1 (d,  $J = 9.8$  Hz, 8C, PPh-CH<sub>ar,o</sub>), 136.2 (Phe-C<sub>ar,q</sub>), 141.3 (2C, Fmoc-C<sub>ar,q</sub>), 143.9 (2C, Fmoc-C<sub>ar,q</sub>), 156.0 (Fmoc-CO), 169.4 (CO), 170.0 (CO), 171.3 (CO), 172.9 (CO).

<sup>31</sup>P-NMR: (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 12.6 (bs), 13.3 (bs).

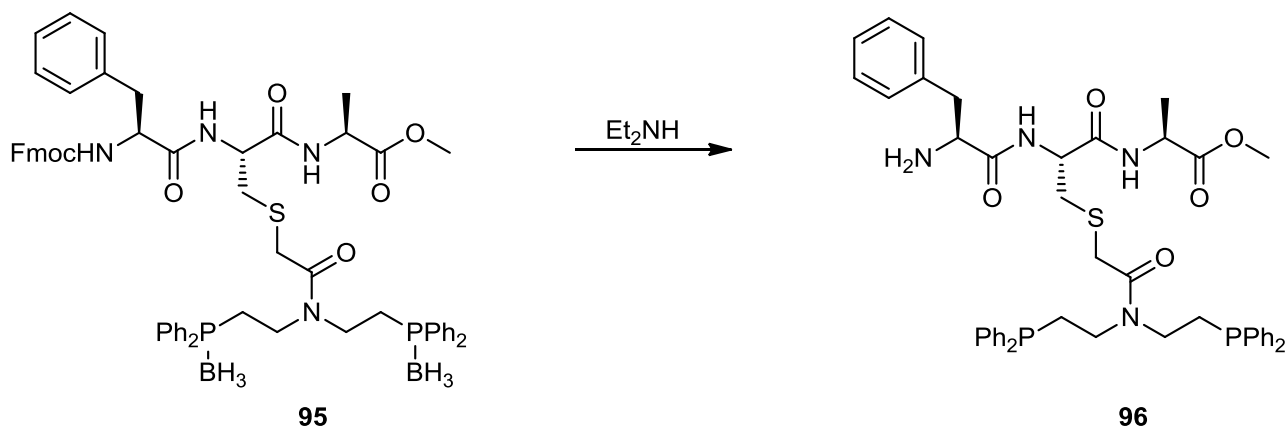
HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>61</sub>H<sub>68</sub>B<sub>2</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>7</sub>P<sub>2</sub>S[M + Na]<sup>+</sup>: 1107.4381; found: 1107.4381.

IR: (neat)  $\tilde{\nu}$  = 3291 (br, w), 3060 (w), 2951 (w), 2382 (m), 1719 (w), 1649 (s), 1535 (m), 1451 (m), 1437 (s), 1368 (w), 1297 (m), 1214 (m), 1148 (m), 1108 (m), 1062 (m), 999 (w), 910 (m), 804 (w), 733 (s), 701 (s), 648 (w), 621 (w), 596 (w), 500 (m), 475 (w), 427 (w).

Spec. Rotation:  $c = 10.1$  mg/1 mL = 1.0,  $d = 10$  cm = 1 dm, CHCl<sub>3</sub>,  $T = 20$  °C

$[\alpha]_D = -14.1$ ,  $[\alpha]_{578} = -14.6$ ,  $[\alpha]_{546} = -16.1$ ,  $[\alpha]_{436} = -29.7$ ,  $[\alpha]_{365} = -48.1$ .

L-Phenylalanine-*S*-[2'-methano-*N,N*-bis-(2-diphenylphosphine-ethyl)-amido]-L-Cysteine-L-Alanine-methylester (**96**)



tripeptide-phosphine borane **95** [1084.85]

1.00 eq 46.1  $\mu\text{mol}$  50 mg

$\text{Et}_2\text{NH}$  [73.14; 0.71]

0.5 mL

Tripeptide-phosphine borane **95** (50 mg, 46  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in diethylamine (0.5 mL) and the solution was stirred for 3 h at room temperature. The solvent was removed under high vacuum and the crude product was purified by flash chromatography on silica (5 g,  $\text{CHCl}_3$  / MeOH 10:0.1) to give phosphine **96** (31 mg, 37.4  $\mu\text{mol}$ , 81 %) as colourless oil.

TLC:  $R_f$  = 0.12 ( $\text{CHCl}_3$  / MeOH 10:0.1).

$^1\text{H}$ -NMR: (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 1.40 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 3H, Ala- $\text{H}_\beta$ ), 2.20-2.42 (m, 4H,  $\text{PCH}_2$ ), 2.72 (dd,  $J$  = 13.7, 9.3 Hz, 1H, Phe- $\text{H}_\beta$ ), 2.76 (dd,  $J$  = 14.5, 6.9 Hz, 1H, Cys- $\text{H}_\beta$ ), 2.83 (dd,  $J$  = 14.5, 6.1 Hz, 1H, Cys- $\text{H}_\beta$ ), 3.08 (d,  $J$  = 14.9 Hz, 1H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.21 (dd,  $J$  = 13.7, 4.1 Hz, 1H, Phe- $\text{H}_\beta$ ), 3.27 (d,  $J$  = 15.1 Hz, 1H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.21-3.56 (m, 4H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.61 (dd,  $J$  = 9.3, 3.9 Hz, 1H, Phe- $\text{H}_\alpha$ ), 3.66 (s, 3H, OMe), 4.48 (quin,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, Ala- $\text{H}_\alpha$ ), 4.66 (dt,  $J$  = 7.2, 7.1 Hz, 1H, Cys- $\text{H}_\alpha$ ), 7.16-7.48 (m, 25H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7.86 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H, Ala-NH), 8.15 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, Cys-NH).

$^{13}\text{C}$ -NMR: (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 17.8 (1C, Ala- $\text{C}_\beta$ ), 26.4 (d,  $J$  = 14.4 Hz, 1C,  $\text{PCH}_2$ ), 28.1 (d,  $J$  = 15.0 Hz, 1C,  $\text{PCH}_2$ ), 33.6 (1C,  $\text{SCH}_2$ ), 35.9 (1C, Cys- $\text{C}_\beta$ ), 41.2 (1C,

## Experimenteller Teil

Phe-C<sub>β</sub>), 44.3 (d,  $J = 24.9$  Hz, 1C, NCH<sub>2</sub>), 46.0 (d,  $J = 26.6$  Hz, 1C, NCH<sub>2</sub>), 48.4 (1C, Ala-C<sub>α</sub>), 51.5 (1C, Cys-C<sub>α</sub>), 52.4 (1C, OMe), 56.6 (1C, Phe-C<sub>α</sub>), 126.9 (1C, Phe-C<sub>ar,q</sub>), 128.6 (d,  $J = 6.9$  Hz, 4C, PPh<sub>2</sub>-CH<sub>ar</sub>), 128.9 (d,  $J = 7.5$  Hz, 4C, PPh<sub>2</sub>-CH<sub>ar</sub>), 128.9 (2C, Phe-CH<sub>ar</sub>), 129.3 (4C, PPh<sub>2</sub>-C<sub>ar,q</sub>), 129.5 (2C, Phe-CH<sub>ar</sub>), 132.7 (d,  $J = 19.1$  Hz, 4C, PPh<sub>2</sub>-CH<sub>ar</sub>), 132.8 (d,  $J = 19.1$  Hz, 4C, PPh<sub>2</sub>-CH<sub>ar</sub>), 137.2 (d,  $J = 12.1$  Hz, 2C, PPh<sub>2</sub>-CH<sub>ar,p</sub>), 137.9 (d,  $J = 12.1$  Hz, 2C, PPh<sub>2</sub>-CH<sub>ar,p</sub>), 137.9 (1C, Phe-CH<sub>ar,p</sub>), 169.3 (CO), 170.1 (CO), 173.0 (CO), 174.7 (CO).

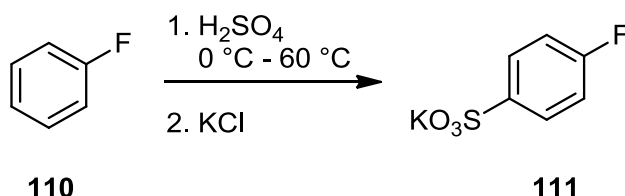
<sup>31</sup>P-NMR: (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = -19.9, -21.1$ .

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>46</sub>H<sub>53</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>P<sub>2</sub>S [M + H]<sup>+</sup>: 835.3206; found: 835.3206.

IR (neat)  $\tilde{\nu} = 3057$  (m), 2994 (m), 2941 (m), 2383 (w), 1744 (m), 1648 (s), 1507 (m), 1435 (s), 1360 (m), 1294 (m), 1209 (m), 1159 (m), 1064 (w), 1026 (w), 997 (w), 914 (w), 841 (w), 743 (s), 698 (s), 508 (m), 428 (w).

Spec. Rotation:  $c = 10.3$  mg/1 mL = 1.0,  $d = 10$  cm = 1 dm, CHCl<sub>3</sub>, T = 20 °C  
 $[\alpha]_D = -36.0$ ,  $[\alpha]_{578} = -38.4$ ,  $[\alpha]_{546} = -42.7$ .

## 8.2.4 Synthese eines wasserlöslichen Phosphins

Potassium *p*-fluorobenzenesulfonate (**111**)<sup>[49]</sup>

fluorobenzene [96.10; 1.02]

1.00 eq    0.50 mmol    47 mL

Fluorobenzene (47 mL) was added to concentrated sulfuric acid (100 mL) at 0 °C within 30 min. The reaction mixture was stirred for 14 h at 60 °C and poured into a mixture of ice (250 g), water (150 mL) and KCl (100 g). The mixture was stirred for another 60 min and the occurring solid was filtered off and dried at 80 °C in high vacuum. The crude product was purified by crystallization in water. The analytical data was in agreement with the reported values.<sup>[49]</sup>

mp: > 300 °C (H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.25 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H, FCCH<sub>ar</sub>), 7.84 (dd, *J* = 8.7, 5.3 Hz, 2H, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>).

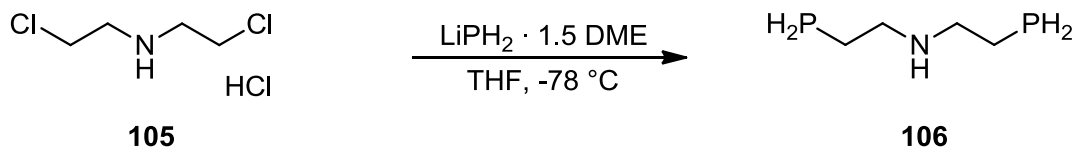
<sup>13</sup>C-NMR: (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 116.5 (d, *J* = 22.6 Hz, FCCH<sub>ar</sub>), 128.7 (d, *J* = 9.3 Hz, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>), 139.3 (SO<sub>3</sub>C<sub>ar,q</sub>), 164.7 (d, *J* = 249.0 Hz, FC<sub>ar,q</sub>).

<sup>19</sup>F-NMR: (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 109.1.

HRMS: (ESI): *m/z* calcd for C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>FO<sub>3</sub>S [M]<sup>-</sup>: 174.9871; found: 174.9870.

IR: (neat)  $\tilde{\nu}$  = 3105 (w), 3074 (w), 1592 (m), 1496 (m), 1407 (w), 1214 (s), 1178 (bs), 1125 (s), 1035 (m), 1010 (m), 950 (w), 837 (s), 709 (w), 682 (s), 557 (s), 398 (w).



*N,N*-Bis-2-phosphinoethylamine (**106**)

$\text{LiPH}_2 \cdot 1.5 \text{ DME}$ [175.11]	3.13 eq	1.09 mmol	190 mg
<i>N,N</i> -bis-(2-chloroethyl)amine hydrochloride [178.49]	1.00 eq	0.35 mmol	61.5 mg

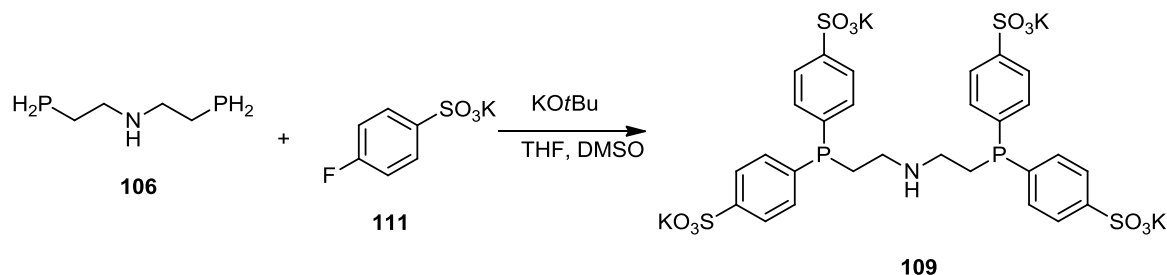
To a suspension of  $\text{LiPH}_2 \cdot 1.5$  dimethoxyethane (190 mg, 1.09 mmol) in THF (5 mL) at  $-78^\circ\text{C}$  was added bis-(2-chloroethyl)amine hydrochloride (61.5 mg, 0.35 mmol) as solid. The reaction mixture was warmed to room temperature overnight and the solid was filtered off and washed with THF (3 x 2 mL). The crude product solution was used for next steps without further purification.

$^1\text{H-NMR}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 1.62-1.78 (m, 4H,  $\text{PCH}_2$ ), 2.41 (bs, 1H, NH), 2.65 (ddd,  $J$  = 195.3, 7.5, 7.5 Hz, 4H,  $\text{PH}_2$ ), 2.79 (td,  $J$  = 7.4, 6.5 Hz, 4H,  $\text{NCH}_2$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 14.5 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 2C,  $\text{PCH}_2$ ), 51.9 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 2C,  $\text{NCH}_2$ ).

$^{31}\text{P-NMR}$ : (121 MHz, THF)  $\delta$  =  $-149.6$ .

HRMS: (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_4\text{H}_{14}\text{NP}_2$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 138.0596; found: 138.0596.

*N,N*-Bis-(2-di-*p*-potassiumsulfonatephenylphosphinoethyl)amine (**109**)

Potassium <i>p</i> -fluorobenzenesulfonate [214.26]	5.00 eq	1.73 mmol	371 mg
Bis-(2-phosphinoethyl)amine in THF[137.10]	1.00 eq	0.35 mmol	10 mL
KOtBu [112.21]	15.0 eq	5.18 mmol	581 mg

A solution of bis-(2-phosphinoethyl)amine (10 mL, 0.35 mmol) in THF was diluted with DMSO (5 mL), and KOtBu (387 mg, 3.45 mmol) and potassium *p*-fluorobenzenesulfonate (371 mg, 1.73 mmol) were added as solids. The reaction mixture turned over orange into a dark red and was stirred overnight. The next day, KOtBu (194 mg, 1.73 mmol) was added again. The solution was stirred for another 24 h and after adding THF (11 mL) the product precipitated. The solid was filtered off and washed with DMSO (2 x 5 mL) and THF (2 x 5 mL). The solid was dried in high vacuum to yield a mixture of phosphine **109**, potassium fluoride and DMSO (502 mg, 0.23 mmol, 67%) as a yellow solid.

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 2.14-2.28 (m, 4H, PCH<sub>2</sub>), 2.38-2.53 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>), 7.49 (t, *J* = 7.6 Hz, 8H, PCCH<sub>ar</sub>), 7.75 (d, *J* = 7.7 Hz, 8H, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 26.9 (d, *J* = 8.7 Hz, 2C, PCH<sub>2</sub>), 45.1 (d, *J* = 19.1 Hz, 2C, NCH<sub>2</sub>), 126.2 (d, *J* = 6.9 Hz, 8C, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>), 133.7 (d, *J* = 19.1 Hz, 8C, PCCH<sub>ar</sub>), 141.5 (d, *J* = 12.1 Hz, 4C, PC<sub>ar,q</sub>), 143.2 (4C, SO<sub>3</sub>C<sub>ar,q</sub>).

<sup>31</sup>P-NMR: (121 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = -20.1.

HRMS: (ESI): *m/z* calcd for C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>12</sub>P<sub>2</sub>S<sub>4</sub>Na<sub>3</sub>[M]<sup>-</sup>: 825.9433; found: 825.9442.

## Experimenteller Teil

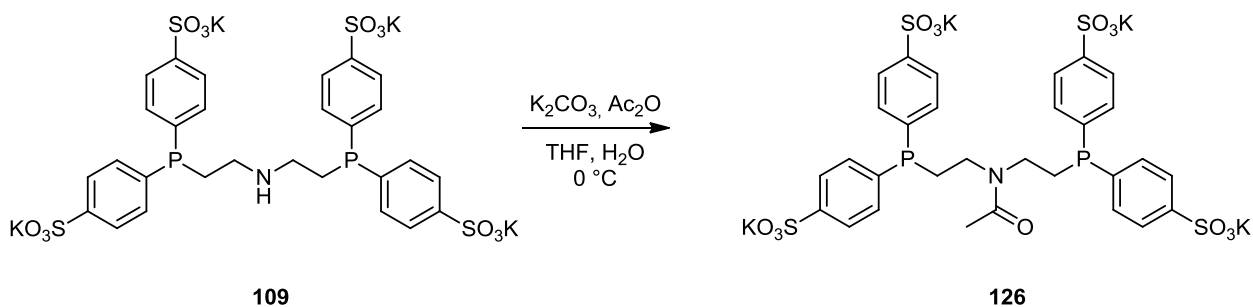
IR: (neat)  $\tilde{\nu}$  = 1584 (w), 1493 (w), 1410 (w), 1193 (bs), 1125 (s), 1032 (s), 1009 (s), 954 (m), 894 (w), 825 (m), 754 (w), 703 (m), 638 (s), 565 (s).

## Amide formation

General procedure for the amide formation with the watersoluble phosphine.

To a solution of amine **109** (0.06 mmol, 1.00 eq) in water (2 mL) was added  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.12 mmol, 2.00 eq). The solution was cooled to 0 °C and a solution of acid chloride or acid anhydride (0.09 mmol, 1.50 eq) in THF (0.4 mL) was added. After ten minutes, the ice bath was removed and the solution was stirred for another ten minutes. The reaction was controlled via  $^{31}\text{P}$ -NMR, and after full conversion the solvents were removed under high vacuum and the crude product was purified by flash chromatography on RP-C18 silica (3.4 g,  $\text{H}_2\text{O}$ ) to give the amide.

## Acetylamide **126**



Acetylamide **126** (8 mg, 8.37  $\mu\text{mol}$ , 13%) was obtained as a colourless solid.

mp: > 250 °C (decomposition) ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

$^1\text{H}$ -NMR: (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  = 1.71 (s, 3H, Me), 2.42-2.51 (m, 4H,  $\text{PCH}_2$ ), 3.26-3.34 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.37-3.46 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 7.59 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 4H,  $\text{PCCH}_{\text{ar}}$ ), 7.61

## Experimenteller Teil

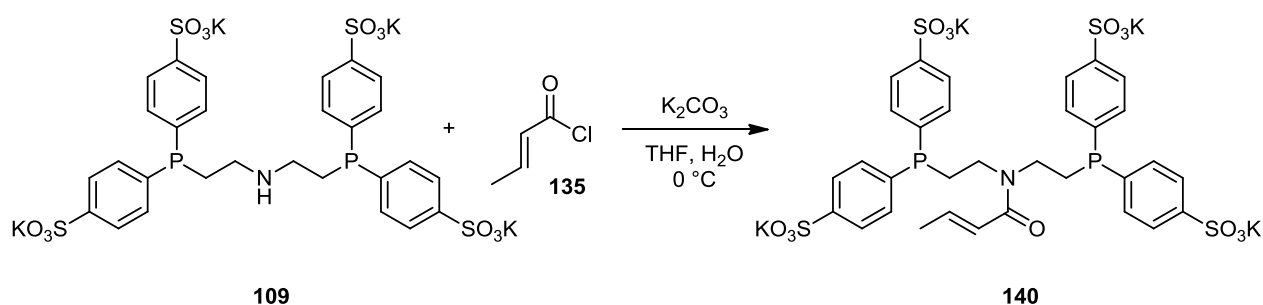
(t,  $J = 7.9$  Hz, 4H,  $\text{PCCH}_{\text{ar}}$ ), 7.81 (d,  $J = 7.5$  Hz, 4H,  $\text{SO}_3\text{CCH}_{\text{ar}}$ ), 7.83 (d,  $J = 7.5$  Hz, 4H,  $\text{SO}_3\text{CCH}_{\text{ar}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR: (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 21.0$  (Me), 25.2 (d,  $J = 12.2$  Hz,  $\text{PCH}_2$ ), 26.4 (d,  $J = 12.2$  Hz,  $\text{PCH}_2$ ), 43.3 (d,  $J = 17.6$  Hz,  $\text{NCH}_2$ ), 46.4 (d,  $J = 19.3$  Hz,  $\text{NCH}_2$ ), 126.2 (d,  $J = 7.2$  Hz, 4C,  $\text{SO}_3\text{CCH}_{\text{ar}}$ ), 126.3 (d,  $J = 7.2$  Hz, 4C,  $\text{SO}_3\text{CCH}_{\text{ar}}$ ), 133.8 (d,  $J = 18.8$  Hz, 4C,  $\text{PCCH}_{\text{ar}}$ ), 133.9 (d,  $J = 19.1$  Hz, 4C,  $\text{PCCH}_{\text{ar}}$ ), 141.1 (d,  $J = 11.2$  Hz, 2C,  $\text{PC}_{\text{ar,q}}$ ), 141.5 (d,  $J = 11.2$  Hz, 2C,  $\text{PC}_{\text{ar,q}}$ ), 143.8 (2C,  $\text{SO}_3\text{C}_{\text{ar,q}}$ ), 143.9 (2C,  $\text{SO}_3\text{C}_{\text{ar,q}}$ ), 174.3 (CO).

$^{31}\text{P}$ -NMR: (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = -19.4, -20.6$ .

IR: (neat)  $\tilde{\nu} = 1622$  (bm), 1483 (w), 1425 (w), 1383 (w), 1181 (bs), 1126 (s), 1034 (s), 1004 (s), 823 (m), 754 (w), 711 (w), 638 (s), 565 (s), 463 (m), 423 (m).

## Crotonylamide **140**



Crotonylamide **140** (5 mg, 5.09  $\mu\text{mol}$ , 12%) was obtained as a colourless solid.

mp:  $> 250$   $^\circ\text{C}$  (decomposition) ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

$^1\text{H}$ -NMR: (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 1.64$  (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Me), 2.36-2.54 (m, 4H,  $\text{PCH}_2$ ), 3.24-3.39 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.43-3.58 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 5.61 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H,  $=\text{CH}$ ), 6.48 (dd,  $J = 6.7, 15.1$  Hz, 1H,  $=\text{CHMe}$ ), 7.54 (t,  $J = 7.8$  Hz, 8H,

## Experimenteller Teil

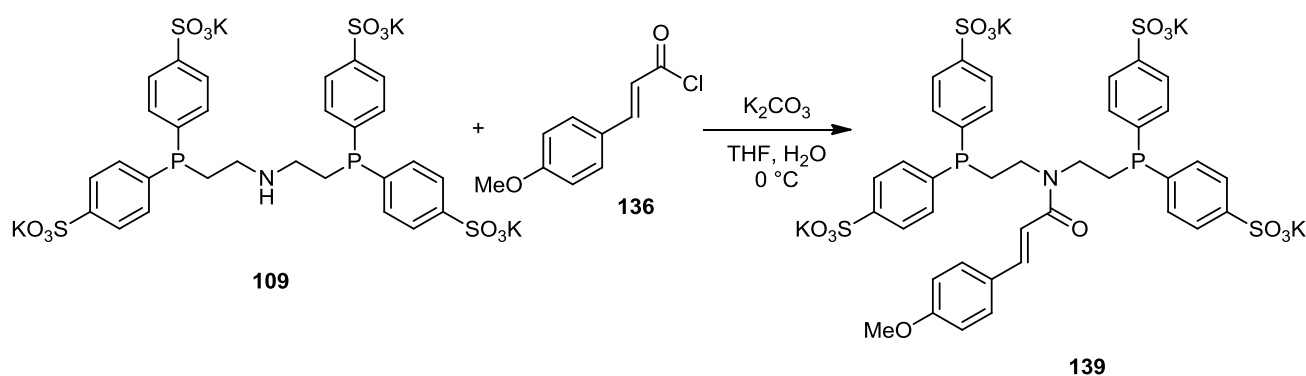
PCCH<sub>ar</sub>), 7.73 (d,  $J = 8.7$  Hz, 4H, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>), 7.76 (d,  $J = 8.1$  Hz, 4H, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta = 18.2$  (Me), 25.4 (d,  $J = 12.1$  Hz, PCH<sub>2</sub>), 27.1 (d,  $J = 11.3$  Hz, PCH<sub>2</sub>), 44.1 (d,  $J = 17.3$  Hz, NCH<sub>2</sub>), 45.7 (d,  $J = 20.3$  Hz, NCH<sub>2</sub>), 121.4 (=CH), 126.1 (d,  $J = 7.5$  Hz, 4C, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>), 126.3 (d,  $J = 7.5$  Hz, 4C, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>), 133.7 (d,  $J = 18.8$  Hz, 4C, PCCH<sub>ar</sub>), 133.9 (d,  $J = 18.8$  Hz, 4C, PCCH<sub>ar</sub>), 141.0 (d,  $J = 11.3$  Hz, 2C, PC<sub>ar,q</sub>), 141.5 (d,  $J = 11.3$  Hz, 2C, PC<sub>ar,q</sub>), 143.7 (2C, SO<sub>3</sub>C<sub>ar,q</sub>), 143.9 (2C, SO<sub>3</sub>C<sub>ar,q</sub>), 144.5 (1C, =CHMe), 169.6 (CO).

<sup>31</sup>P-NMR: (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta = -19.0, -21.4$ .

IR: (neat)  $\tilde{\nu} = 1657$  (w), 1607 (w), 1359 (w), 1186 (bs), 1127 (s), 1034 (s), 1004 (s), 822 (m), 754 (m), 640 (s), 566 (s), 427 (s).

### *p*-Methoxy cinnamic amide **139**



*p*-Methoxy cinnamic amide **139** (12 mg, 11.2  $\mu$ mol, 16%) was obtained as a colourless solid.

mp:  $> 250$  °C (decomposition) (H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta = 2.30$ -2.42 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>), 2.43-2.54 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>), 3.37-3.50 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.63-3.83 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 6.17 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H,

## Experimenteller Teil

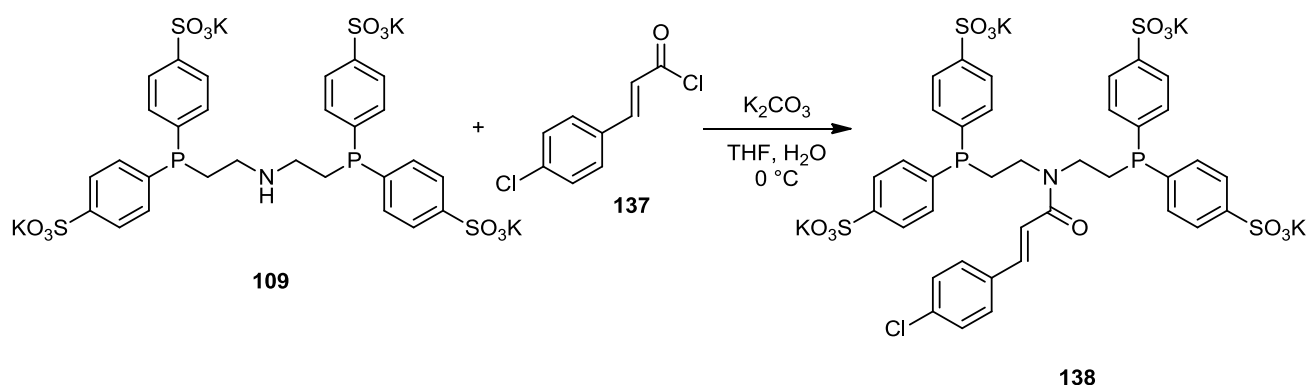
=CH), 6.96 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, MeOCCH<sub>ar</sub>), 7.21 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, CH<sub>ar</sub>), 7.25 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H, =CHAr), 7.42 (t,  $J = 8.0$  Hz, 4H, PCCH<sub>ar</sub>), 7.55 (t,  $J = 7.9$  Hz, 4H, PCCH<sub>ar</sub>), 7.68 (d,  $J = 7.8$  Hz, 4H, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>), 7.74 (d,  $J = 8.2$  Hz, 4H, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = 25.7 (d,  $J = 12.1$  Hz, PCH<sub>2</sub>), 27.2 (d,  $J = 12.1$  Hz, PCH<sub>2</sub>), 44.2 (d,  $J = 18.1$  Hz, NCH<sub>2</sub>), 45.9 (d,  $J = 18.1$  Hz, NCH<sub>2</sub>), 56.2 (OMe), 115.2 (2C, MeOCCH<sub>ar</sub>), 115.5 (=CHCO), 126.2 (d,  $J = 6.8$  Hz, 4C, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>), 126.3 (d,  $J = 7.5$  Hz, 4C, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>), 128.1 (C<sub>q,ar</sub>CH=), 130.3 (2C, =CCCH<sub>ar</sub>), 133.7 (d,  $J = 18.8$  Hz, 4C, PCCH<sub>ar</sub>), 133.8 (d,  $J = 18.8$  Hz, 4C, PCCH<sub>ar</sub>), 140.8 (d,  $J = 11.3$  Hz, 2C, PC<sub>ar,q</sub>), 141.5 (d,  $J = 12.0$  Hz, 2C, PC<sub>ar,q</sub>), 143.4 (=CHAr), 143.8 (2C, SO<sub>3</sub>C<sub>ar,q</sub>), 144.0 (2C, SO<sub>3</sub>C<sub>ar,q</sub>), 161.2 (1C, C<sub>q,ar</sub>OMe), 169.5 (CO).

<sup>31</sup>P-NMR: (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = -19.5, -22.7.

IR: (neat)  $\tilde{\nu}$  = 1640 (w), 1599 (bm), 1511 (w), 1431 (w), 1383 (w), 1176 (bs), 1125 (s), 1034 (s), 1003 (s), 822 (m), 754 (w), 637 (s), 562 (m), 465 (m), 433 (m).

### *p*-Chlorocinnamic amide **138**



*p*-Chlorocinnamic amide **138** (22 mg, 20.3  $\mu$ mol, 27%) was obtained as a colourless solid.

mp: > 250 °C (decomposition) (H<sub>2</sub>O).

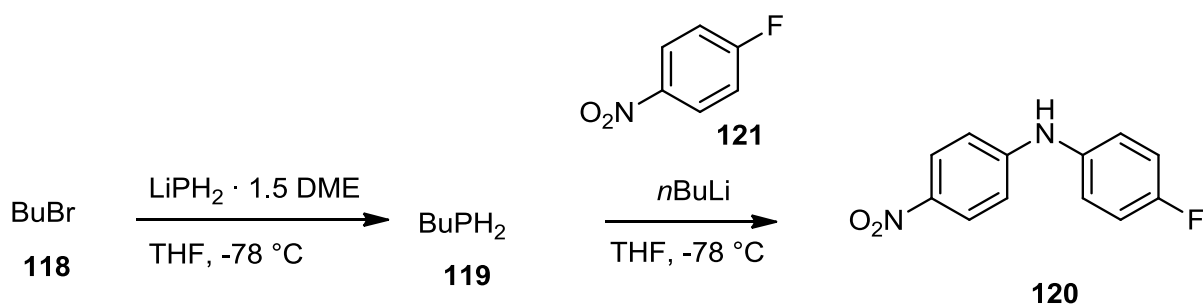
<sup>1</sup>H-NMR: (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = 2.26-2.38 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>), 2.40-2.52 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>), 3.36-3.59 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>), 6.25 (d,  $J$  = 15.7 Hz, 1H, =CH), 7.19 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H, ClCCH<sub>ar</sub>), 7.20 (d,  $J$  = 15.1 Hz, 1H, =CHAr), 7.36 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, CH<sub>ar</sub>CC=), 7.38 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 4H, PCCH<sub>ar</sub>), 7.53 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 4H, PCCH<sub>ar</sub>), 7.66 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 4H, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>), 7.73 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 4H, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = 25.6 (d,  $J$  = 13.6 Hz, PCH<sub>2</sub>), 27.2 (d,  $J$  = 12.1 Hz, PCH<sub>2</sub>), 44.3 (d,  $J$  = 17.3 Hz, NCH<sub>2</sub>), 45.9 (d,  $J$  = 18.8 Hz, NCH<sub>2</sub>), 118.3 (=CHCO), 126.2 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 4C, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>), 126.3 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 4C, SO<sub>3</sub>CCH<sub>ar</sub>), 129.7 (C<sub>q,ar</sub>CH=), 129.8 (2C, ClCCH<sub>ar</sub>), 133.6 (=CC<sub>q,ar</sub>), 133.6 (d,  $J$  = 18.8 Hz, 4C, PCCH<sub>ar</sub>), 133.8 (d,  $J$  = 18.8 Hz, 4C, PCCH<sub>ar</sub>), 136.0 (C<sub>q,ar</sub>Cl), 140.7 (d,  $J$  = 11.3 Hz, 2C, PC<sub>ar,q</sub>), 141.5 (d,  $J$  = 12.1 Hz, 2C, PC<sub>ar,q</sub>), 142.4 (=CHAr), 143.8 (2C, SO<sub>3</sub>C<sub>ar,q</sub>), 144.0 (2C, SO<sub>3</sub>C<sub>ar,q</sub>), 169.2 (CO).

<sup>31</sup>P-NMR: (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = -19.5, -22.7.

IR: (neat)  $\tilde{\nu}$  = 1644 (w), 1587 (bm), 1487 (w), 1408 (w), 1385 (w), 1357 (w), 1182 (bs), 1126 (s), 1035 (s), 1004 (s), 819 (m), 753 (m), 721 (w), 638 (s), 564 (s), 496 (m), 472 (m).

#### 4-Fluoro-*N*-(4-nitrophenyl)aniline (**120**)



## Experimenteller Teil

LiPH <sub>2</sub> · 1.5 DME [175.11]	1.10 eq	0.48 mmol	85 mg
butylbromide [137.02; 1.276]	1.00 eq	0.44 mmol	47.1 µL
fluornitrobenzene [141.10; 1.33]	2.00 eq	0.88 mmol	93 µL
<i>n</i> BuLi [2.5 M in <i>n</i> -hexane]	2.00 eq	0.88 mmol	0.35 mL

To a suspension of LiPH<sub>2</sub> · 1.5 dimethoxyethane (85 mg, 0.48 mmol) in THF (3 mL) at –78 °C was added butylbromide (47.1 µL, 0.44 mmol). The reaction mixture was warmed up to room temperature overnight and the crude product solution was used for the next step without further purification.

To the solution of butylphosphine in THF at –78 °C *n*BuLi (0.15 mL, 0.38 mmol) and five minutes later fluornitrobenzene (37 µL, 0.35 mmol) were added. After 15 minutes, again *n*BuLi (0.12 mL, 0.31 mmol) and five minutes later fluornitrobenzene (32.5 µL, 0.31 mmol) were added and 15 minutes later *n*BuLi (0.08 mL, 0.22 mmol) and fluornitrobenzene (23.5 µL, 0.22 mmol) were added again. The solution was warmed up to room temperature and stirred for 4 days. The crude product was purified by flash chromatography on silica (15 g, *n*-pentane / ethyl acetate 5:1) to give amine **120** (66 mg, 0.28 mmol, 64%) as a brown oil.

TLC:  $R_f$  = 0.11 (*n*-pentane / ethyl acetate 5:1).

<sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 6.13 (NH), 6.83 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, NO<sub>2</sub>CCH<sub>ar</sub>CH<sub>ar</sub>), 7.10 (dd, *J* = 8.6, 8.6 Hz, 2H, FCCH<sub>ar</sub>), 7.19 (dd, *J* = 8.8, 4.9 Hz, 2H, FCCH<sub>ar</sub>CH<sub>ar</sub>), 8.11 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H, NO<sub>2</sub>CCH<sub>ar</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 113.3 (2C, NO<sub>2</sub>CCH<sub>ar</sub>CH<sub>ar</sub>), 116.8 (d, *J* = 22.6 Hz, 2C, FCCH<sub>ar</sub>), 125.0 (d, *J* = 8.3 Hz, 2C, FCCH<sub>ar</sub>CH<sub>ar</sub>), 126.4 (2C, NO<sub>2</sub>CCH<sub>ar</sub>), 135.5 (d, *J* = 3.0 Hz, FCCH<sub>ar</sub>CH<sub>ar</sub>C<sub>ar,q</sub>), 140.0 (NO<sub>2</sub>C<sub>ar,q</sub>), 150.9 (NO<sub>2</sub>CCH<sub>ar</sub>CH<sub>ar</sub>C<sub>ar,q</sub>), 160.2 (d, *J* = 245.6 Hz, FC<sub>ar,q</sub>).

<sup>19</sup>F-NMR: (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 116.7.

HRMS: (ESI): *m/z* calcd for C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>F<sub>1</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub> [M + Na]<sup>+</sup>: 255.0540; found: 255.0542.



IR: (neat)  $\tilde{\nu}$  = 3340 (m), 1590 (m), 1539 (w), 1515 (m), 1467 (m), 1341 (m), 1290 (s), 1222 (w), 1184 (w), 1109 (m), 828 (m), 748 (w), 564 (w), 495 (w).

### 8.2.5 Proteinexpression and -aufreinigung

**Gene expression:** CA II-H64C was expressed and purified according to the Glutathione-S-Transferase (GST) gene fusion system handbook (*Amersham Bioscience*) with the following adjusted Protocol.<sup>[42]</sup> A first 100 mL culture was incubated in the presence of 100  $\mu\text{g/mL}$  amp and 34  $\mu\text{g/mL}$  cam overnight at 37 °C. 10 mL of this solution were used to inoculate a 1 L expression culture with 100  $\mu\text{g/mL}$  amp. Expression of the CA II glutathione-S-transferase fusion protein was induced at an optical density at 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) of 0.6 with 2 mM IPTG, and incubation was continued for 4 h at 32 °C.

**Lysis:** Cells were harvested by centrifugation at 5000 rpm for 17 min at 4 °C. The cell pellet was resuspended with 150 mL PBS buffer, which contained a protease inhibitor cocktail tablet and approximately 100 mg lysozyme. After chilling for 30 min on ice, the cells were lysed by ultrasonic sonication using a *Branson Sonifier 250*, applying 7 cycles of 2 min with duty cycle set to 70 and output control to 4 and with a break of 20 min between the cycles. This solution was centrifuged at 20000 rpm for 45 min at 4 °C and filtered (22  $\mu\text{m}$ ) to separate the soluble fractions from the insoluble material.

**Protein purification:** For the all purification steps was used an *ÄKTA FPLC* from *Amersham Pharmacia Biosciences*. The flow-rate along all purification steps was adjusted to a maximum pressure of 0.25 MPa. The sample was applied to a *HiPrep GSTPrep FF 16/10* column (*GE Healthcare*) at a flow-rate of 1 mL/min. Afterwards the column was washed with 10 column-volumes of PBS buffer at a flow-rate of 3 mL/min. For cleaving the GST-tag 500 I.U. of thrombin (from *Beriplast*, *CSL Behring*) were added with 1 mL/min and the column was slightly shaken for 16 hours at room temperature. After incubation, the target protein was eluted from the column with approximately three column-volumes of PBS buffer at a flow-rate of 1 mL/min. The elution volume was mixed with the same volume of 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 M NaCl buffer. This mixture was purified over a *HiTrap Benzamidin* column (*Amersham Bioscience*) at a flow-rate of 1 mL/min to separate the thrombin from the CA II. As a final purification step, the probe was applied on a *HiLoad 26/60 Superdex200*

*size exclusion* column (*GE Healthcare*) to purify the target enzyme from any last impurity and change the buffer to 50 mM Tris-HCl pH 7.8. To monitor the different purification steps, the probes were controlled by SDS-PAGE. The final purification of 1 L expression culture yielded approximately 30 mg *hCA II-H64C*. Finally the GSTPrep column was washed with reduced glutathione buffer to elute the GST-tag from the column and check for full thrombin cleavage. The purified enzyme was concentrated using *Vivaspin20* (MW: 10 kDa) columns to a final concentration of 10 mg/mL, which was used for crystallization experiments. For further experiments the enzyme was diluted to the required concentration using a 50 mM Tris-HCl pH 7.8 buffer.

### 8.2.6 Proteinkristallisation

The *hCA II-H64C* crystals were grown using the sitting drop vapor diffusion method at 18 °C by mixing 5  $\mu$ L (2  $\mu$ L) of the protein solution (10 mg/mL) with 5  $\mu$ L (2  $\mu$ L) of a well solution (2.75 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 M Tris-HCl pH 7.8). Crystals appeared within 4 – 6 weeks in space group  $P2_1$  and took up to 3 – 5 months to reach a sufficient size for X-ray experiments. The typical crystal shape show flat plates.

For cocrystalization experiments 1  $\mu$ L of an inhibitor solution in DMSO, MeCN or  $\text{H}_2\text{O}$  was added for a final concentration of 0.2 – 1 mM.

For soaking experiments crystals were transferred for 1 – 2 days into a soaking solution (3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 – 5 mM inhibitor).

Before data collection, crystals were transferred for about 10 seconds into a cryo-protectant solution (25% glycerol, 75% mother liquor) and afterwards directly flash-frozen in liquid nitrogen.

### 8.2.7 Protein-Dansyl-Kupplung

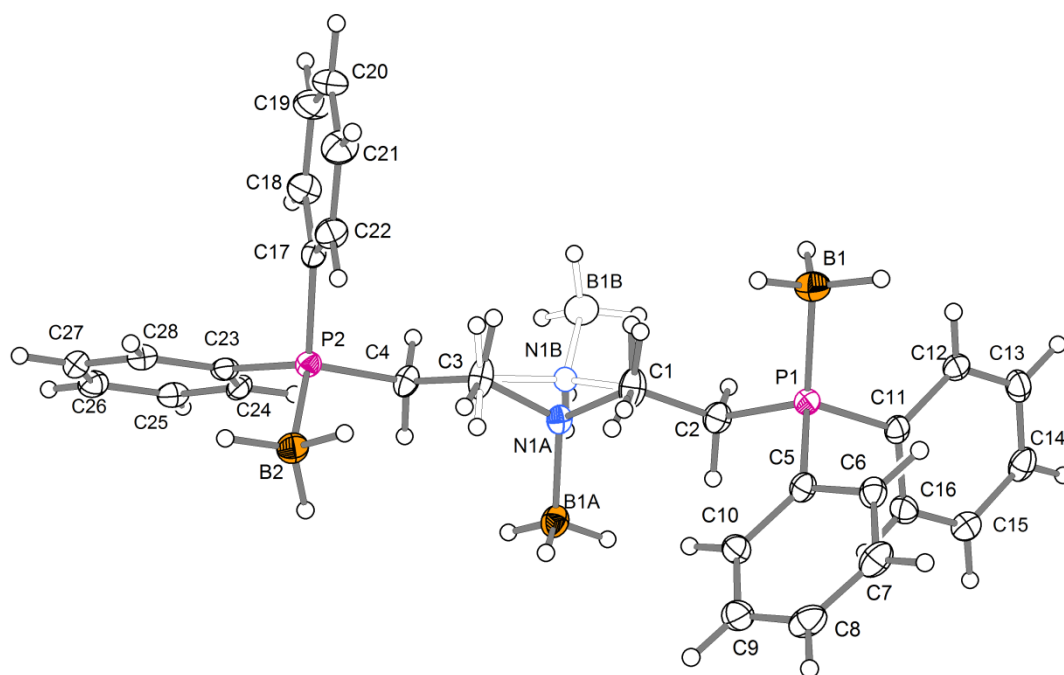
A Dansylchloroacetamid **75** solution (1.2  $\mu$ L, 50 mM in MeCN) was added to a *hCA* II-H64C solution (60  $\mu$ L, 0.1 mM in 50 mM Tris-HCl pH 7.8). The mixture was shaken at 20 °C overnight. The solution was centrifuged at 13000 rpm for 3 min and used for mass experiments and SDS-PAGE. For the SDS-PAGE, to the reaction solution (15  $\mu$ L) was added SDS buffer (15  $\mu$ L). The mixture was denaturated at 95 °C for 5 min and placed on the gel.

A Dansylacrylamid **76** solution (1.2  $\mu$ L, 50 mM in MeCN) was added to a *hCA* II-H64C solution (60  $\mu$ L, 0.1 mM in 50 mM Tris-HCl pH 7.8). The mixture was shaken at 37 °C overnight. The solution was centrifuged at 13000 rpm for 3 min and used for mass experiments and SDS-PAGE. For the SDS-PAGE, to the reaction solution (15  $\mu$ L) was added SDS buffer (15  $\mu$ L). The mixture was denaturated at 95 °C for 5 min and placed on the gel.

### 8.2.8 IC<sub>50</sub>-Wert Bestimmung

The IC<sub>50</sub> values were determined photometrically with *p*-nitrophenol acetate (*p*NPA) as substrate as described by *Pocker and Stone*.<sup>[62]</sup> Acetazolamide was measured as a reference with an IC<sub>50</sub> of 2.9 nM  $\pm$  0.3 nM (Lit.<sup>[63]</sup>: 3.4 nM). A plate reader *Labsystem iEMS Reader MF* was used for the photometric measurement. The buffer solution contained 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 70 nM *hCA* II and 3 mM *p*NPA.

## 8.3 Kristallstrukturdaten

Crystal data of *N,N*-Bis-(2-(diphenylphosphino)ethyl)amine borane (**93**)**Fig. 36:** Crystal structure of phosphino-borane **93**.

Habitus, colour	plate, colourless	
Crystal size	0.19 x 0.09 x 0.08 mm <sup>3</sup>	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P $\bar{1}$	Z = 2
Unit cell dimensions	a = 9.4159(7) Å	$\alpha$ = 87.729(6)°.
	b = 9.4812(7) Å	$\beta$ = 87.272(6)°.
	c = 15.8395(11) Å	$\gamma$ = 74.167(6)°.
Volume	1358.34(17) Å <sup>3</sup>	
Cell determination	5521 peaks with Theta 1.3 to 25°.	
Empirical formula	C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> B <sub>3</sub> N P <sub>2</sub>	
Formula weight	482.96	
Density (calculated)	1.181 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.177 mm <sup>-1</sup>	

## Experimenteller Teil

F(000)	516
Data collection:	
Diffractometer type	STOE IPDS 2T
Wavelength	0.71073 Å
Temperature	100(2) K
Theta range for data collection	2.23 to 25.00°.
Index ranges	-11 ≤ h ≤ 11, -11 ≤ k ≤ 11, -18 ≤ l ≤ 17
Data collection software	STOE X-Area
Cell refinement software	STOE X-Area
Data reduction software	STOE X-Area
Solution and refinement:	
Reflections collected	9198
Independent reflections	4724 [R(int) = 0.0547]
Completeness to theta = 25.00°	98.6 %
Observed reflections	2958 [I > 2(I)]
Reflections used for refinement	4724
Extinction coefficient	X = 0.0059(7)
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	1.0070 and 0.9343
Largest diff. peak and hole	0.324 and -0.280 e.Å <sup>-3</sup>
Solution	Direct methods
Refinement	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Treatment of hydrogen atoms	CH calculated positions, riding model, BH (no disorder) isotr. ref
Programs used	SIR-2008 SHELXL-97 (Sheldrick, 2008) DIAMOND 3.2
S	TOE IPDS2 software
Data / restraints / parameters	4724 / 0 / 352
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	0.862
R index (all data)	wR2 = 0.0757
R index conventional [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0412

# Experimenteller Teil

**Table 7:** Atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2$ ) for **93**.  $U(\text{eq})$  is defined as one third of the trace of the orthogonalized  $U_{ij}$  tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$	Occupancy
P1	0.22356(7)	0.01190(7)	0.78366(4)	0.01775(16)	1
P2	0.15110(7)	0.37455(7)	0.32571(4)	0.01703(16)	1
N1A	0.1938(5)	0.0750(6)	0.5222(4)	0.0169(12)	0.50
N1B	0.2639(5)	0.0759(7)	0.5237(4)	0.0173(12)	0.50
C1	0.2173(3)	0.1090(3)	0.61465(15)	0.0258(6)	1
C2	0.2329(3)	-0.0263(3)	0.67140(15)	0.0218(6)	1
C3	0.1951(3)	0.2149(3)	0.47329(15)	0.0265(6)	1
C4	0.2145(3)	0.1948(3)	0.37794(15)	0.0215(6)	1
C5	0.0309(3)	0.0894(2)	0.81386(15)	0.0184(5)	1
C6	-0.0034(3)	0.1165(3)	0.89974(15)	0.0204(5)	1
C7	-0.1493(3)	0.1749(3)	0.92836(17)	0.0256(6)	1
C8	-0.2610(3)	0.2054(3)	0.87136(17)	0.0280(6)	1
C9	-0.2291(3)	0.1801(3)	0.78634(17)	0.0252(6)	1
C10	-0.0837(3)	0.1214(3)	0.75765(16)	0.0213(6)	1
C11	0.2707(2)	-0.1708(3)	0.83200(15)	0.0185(5)	1
C12	0.4007(2)	-0.2193(3)	0.87690(15)	0.0205(6)	1
C13	0.4438(3)	-0.3628(3)	0.90703(16)	0.0255(6)	1
C14	0.3601(3)	-0.4584(3)	0.89316(16)	0.0245(6)	1
C15	0.2293(3)	-0.4092(3)	0.85085(16)	0.0244(6)	1
C16	0.1855(3)	-0.2669(3)	0.82064(15)	0.0214(6)	1
C17	0.2836(3)	0.4714(3)	0.35201(15)	0.0187(5)	1
C18	0.4263(3)	0.4341(3)	0.31549(16)	0.0252(6)	1
C19	0.5283(3)	0.5043(3)	0.33894(17)	0.0304(6)	1
C20	0.4902(3)	0.6112(3)	0.39878(17)	0.0297(6)	1
C21	0.3490(3)	0.6486(3)	0.43472(17)	0.0280(6)	1
C22	0.2461(3)	0.5797(3)	0.41179(16)	0.0233(6)	1
C23	0.1755(2)	0.3448(3)	0.21341(15)	0.0179(5)	1
C24	0.2260(2)	0.2060(3)	0.17890(15)	0.0193(5)	1
C25	0.2329(3)	0.1915(3)	0.09144(15)	0.0213(6)	1
C26	0.1913(3)	0.3141(3)	0.03916(16)	0.0230(6)	1
C27	0.1434(3)	0.4526(3)	0.07296(16)	0.0219(6)	1
C28	0.1351(2)	0.4676(3)	0.15978(15)	0.0200(6)	1
B1	0.3527(3)	0.1271(4)	0.8117(2)	0.0268(7)	1
B1A	0.0573(6)	0.0030(6)	0.5065(4)	0.0235(13)	0.50
B1B	0.4361(6)	-0.0051(6)	0.5048(4)	0.0259(13)	0.50
B2	-0.0510(3)	0.4684(3)	0.3568(2)	0.0241(7)	1

# Experimenteller Teil

**Table 8:** Bond lengths [Å] and angles [°] for **93**.

P1-C5	1.811(2)	C12-C13	1.381(4)
P1-C11	1.814(2)	C12-H12	0.9500
P1-C2	1.822(3)	C13-C14	1.383(3)
P1-B1	1.919(3)	C13-H13	0.9500
P2-C23	1.806(2)	C14-C15	1.387(3)
P2-C17	1.810(2)	C14-H14	0.9500
P2-C4	1.823(2)	C15-C16	1.372(3)
P2-B2	1.918(3)	C15-H15	0.9500
N1A-C3	1.512(6)	C16-H16	0.9500
N1A-C1	1.551(6)	C17-C22	1.386(3)
N1A-B1A	1.645(7)	C17-C18	1.396(3)
N1A-H1A	0.9300	C18-C19	1.380(3)
N1B-C1	1.505(6)	C18-H18	0.9500
N1B-C3	1.515(6)	C19-C20	1.378(4)
N1B-B1B	1.612(7)	C19-H19	0.9500
N1B-H1B	0.9300	C20-C21	1.380(4)
C1-C2	1.514(3)	C20-H20	0.9500
C1-H1BC	0.9900	C21-C22	1.377(3)
C1-H1BD	0.9900	C21-H21	0.9500
C1-H1AA	0.9854	C22-H22	0.9500
C1-H1AB	0.9877	C23-C28	1.390(3)
C2-H2A	0.9900	C23-C24	1.396(3)
C2-H2B	0.9900	C24-C25	1.394(3)
C3-C4	1.526(3)	C24-H24	0.9500
C3-H3BC	0.9900	C25-C26	1.377(3)
C3-H3BD	0.9900	C25-H25	0.9500
C3-H3AA	0.9885	C26-C27	1.387(3)
C3-H3AB	0.9833	C26-H26	0.9500
C4-H4A	0.9900	C27-C28	1.384(3)
C4-H4B	0.9900	C27-H27	0.9500
C5-C10	1.393(3)	C28-H28	0.9500
C5-C6	1.401(3)	B1-H1C	1.11(3)
C6-C7	1.394(3)	B1-H1D	1.16(3)
C6-H6	0.9500	B1-H1E	1.06(3)
C7-C8	1.382(4)	B1A-H1AC	0.9800
C7-H7	0.9500	B1A-H1AD	0.9800
C8-C9	1.382(4)	B1A-H1AE	0.9800
C8-H8	0.9500	B1B-H1BA	0.9800
C9-C10	1.392(3)	B1B-H1BB	0.9800
C9-H9	0.9500	B1B-H1BE	0.9800
C10-H10	0.9500	B2-H2C	1.18(3)
C11-C16	1.390(3)	B2-H2D	1.13(2)
C11-C12	1.402(3)	B2-H2E	1.10(3)
C5-P1-C11	104.66(11)	C23-P2-B2	111.38(13)
C5-P1-C2	107.32(12)	C17-P2-B2	115.64(12)
C11-P1-C2	102.31(11)	C4-P2-B2	111.47(13)
C5-P1-B1	114.96(13)	C3-N1A-C1	103.9(3)
C11-P1-B1	113.68(13)	C3-N1A-B1A	117.3(4)
C2-P1-B1	112.81(13)	C1-N1A-B1A	117.0(4)
C23-P2-C17	106.38(11)	C3-N1A-H1A	105.9
C23-P2-C4	106.54(11)	C1-N1A-H1A	105.9
C17-P2-C4	104.81(11)	B1A-N1A-H1A	105.9

# Experimenteller Teil

C1-N1B-C3	106.0(4)	C3-C4-H4A	110.0
C1-N1B-B1B	116.5(4)	P2-C4-H4A	110.0
C3-N1B-B1B	118.0(4)	C3-C4-H4B	110.0
C1-N1B-H1B	105.0	P2-C4-H4B	110.0
C3-N1B-H1B	105.0	H4A-C4-H4B	108.4
B1B-N1B-H1B	105.0	C10-C5-C6	118.7(2)
N1B-C1-C2	113.9(3)	C10-C5-P1	124.28(19)
N1B-C1-N1A	25.05(18)	C6-C5-P1	117.04(18)
C2-C1-N1A	110.6(3)	C7-C6-C5	120.7(2)
N1B-C1-H1BC	85.6	C7-C6-H6	119.7
C2-C1-H1BC	109.5	C5-C6-H6	119.7
N1A-C1-H1BC	109.5	C8-C7-C6	119.6(2)
N1B-C1-H1BD	126.4	C8-C7-H7	120.2
C2-C1-H1BD	109.5	C6-C7-H7	120.2
N1A-C1-H1BD	109.5	C9-C8-C7	120.6(2)
H1BC-C1-H1BD	108.1	C9-C8-H8	119.7
N1B-C1-H1AA	108.7	C7-C8-H8	119.7
C2-C1-H1AA	109.2	C8-C9-C10	120.0(2)
N1A-C1-H1AA	87.7	C8-C9-H9	120.0
H1BC-C1-H1AA	127.8	C10-C9-H9	120.0
H1BD-C1-H1AA	24.4	C9-C10-C5	120.5(2)
N1B-C1-H1AB	108.6	C9-C10-H10	119.7
C2-C1-H1AB	108.8	C5-C10-H10	119.7
N1A-C1-H1AB	129.7	C16-C11-C12	119.3(2)
H1BC-C1-H1AB	25.8	C16-C11-P1	121.17(18)
H1BD-C1-H1AB	84.8	C12-C11-P1	119.39(18)
H1AA-C1-H1AB	107.5	C13-C12-C11	119.5(2)
C1-C2-P1	113.45(17)	C13-C12-H12	120.3
C1-C2-H2A	108.9	C11-C12-H12	120.3
P1-C2-H2A	108.9	C12-C13-C14	120.6(2)
C1-C2-H2B	108.9	C12-C13-H13	119.7
P1-C2-H2B	108.9	C14-C13-H13	119.7
H2A-C2-H2B	107.7	C13-C14-C15	120.0(2)
N1A-C3-N1B	25.35(18)	C13-C14-H14	120.0
N1A-C3-C4	113.1(3)	C15-C14-H14	120.0
N1B-C3-C4	113.0(3)	C16-C15-C14	119.9(2)
N1A-C3-H3BC	109.0	C16-C15-H15	120.1
N1B-C3-H3BC	86.0	C14-C15-H15	120.1
C4-C3-H3BC	109.0	C15-C16-C11	120.8(2)
N1A-C3-H3BD	109.0	C15-C16-H16	119.6
N1B-C3-H3BD	128.2	C11-C16-H16	119.6
C4-C3-H3BD	109.0	C22-C17-C18	119.1(2)
H3BC-C3-H3BD	107.8	C22-C17-P2	120.07(17)
N1A-C3-H3AA	128.0	C18-C17-P2	120.76(19)
N1B-C3-H3AA	108.8	C19-C18-C17	120.2(2)
C4-C3-H3AA	109.1	C19-C18-H18	119.9
H3BC-C3-H3AA	25.9	C17-C18-H18	119.9
H3BD-C3-H3AA	83.8	C20-C19-C18	120.3(2)
N1A-C3-H3AB	86.3	C20-C19-H19	119.9
N1B-C3-H3AB	109.3	C18-C19-H19	119.9
C4-C3-H3AB	108.8	C19-C20-C21	119.6(2)
H3BC-C3-H3AB	128.7	C19-C20-H20	120.2
H3BD-C3-H3AB	25.8	C21-C20-H20	120.2
H3AA-C3-H3AB	107.7	C22-C21-C20	120.7(2)
C3-C4-P2	108.27(17)	C22-C21-H21	119.6



# Experimenteller Teil

C20-C21-H21	119.6	C27-C28-H28	119.8
C21-C22-C17	120.1(2)	C23-C28-H28	119.8
C21-C22-H22	119.9	P1-B1-H1C	100.4(14)
C17-C22-H22	119.9	P1-B1-H1D	106.0(12)
C28-C23-C24	119.4(2)	H1C-B1-H1D	112.1(19)
C28-C23-P2	117.20(18)	P1-B1-H1E	105.0(13)
C24-C23-P2	123.36(18)	H1C-B1-H1E	115(2)
C25-C24-C23	119.9(2)	H1D-B1-H1E	116.4(19)
C25-C24-H24	120.0	N1B-B1B-H1BA	109.5
C23-C24-H24	120.0	N1B-B1B-H1BB	109.5
C26-C25-C24	120.0(2)	H1BA-B1B-H1BB	109.5
C26-C25-H25	120.0	N1B-B1B-H1BE	109.5
C24-C25-H25	120.0	H1BA-B1B-H1BE	109.5
C25-C26-C27	120.4(2)	H1BB-B1B-H1BE	109.5
C25-C26-H26	119.8	P2-B2-H2C	106.5(14)
C27-C26-H26	119.8	P2-B2-H2D	103.0(12)
C28-C27-C26	119.9(2)	H2C-B2-H2D	112.6(18)
C28-C27-H27	120.1	P2-B2-H2E	104.6(12)
C26-C27-H27	120.1	H2C-B2-H2E	112.7(19)
C27-C28-C23	120.4(2)	H2D-B2-H2E	116.1(17)

**Table 9:** Anisotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2$ ) for **93**. The anisotropic displacement factor exponent takes the form:  $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U <sup>11</sup>	U <sup>22</sup>	U <sup>33</sup>	U <sup>23</sup>	U <sup>13</sup>	U <sup>12</sup>
P1	0.0166(3)	0.0203(4)	0.0165(4)	0.0005(3)	0.0002(3)	-0.0055(3)
P2	0.0169(3)	0.0179(3)	0.0166(4)	-0.0002(3)	0.0003(3)	-0.0053(3)
N1A	0.018(3)	0.018(2)	0.013(2)	-0.0034(18)	0.003(3)	-0.002(3)
N1B	0.016(3)	0.021(2)	0.016(2)	0.0028(19)	-0.002(3)	-0.006(3)
C1	0.0368(15)	0.0230(14)	0.0139(14)	-0.0028(11)	0.0042(12)	-0.0026(12)
C2	0.0233(13)	0.0212(13)	0.0201(14)	-0.0009(11)	0.0016(11)	-0.0049(11)
C3	0.0431(16)	0.0168(13)	0.0161(14)	0.0013(11)	0.0030(12)	-0.0030(12)
C4	0.0276(14)	0.0209(13)	0.0159(13)	0.0007(11)	0.0027(11)	-0.0074(11)
C5	0.0200(12)	0.0154(13)	0.0187(14)	0.0011(11)	0.0008(11)	-0.0033(10)
C6	0.0251(13)	0.0172(13)	0.0194(13)	0.0014(11)	-0.0021(11)	-0.0065(10)
C7	0.0274(14)	0.0218(14)	0.0256(15)	-0.0008(12)	0.0091(12)	-0.0052(11)
C8	0.0198(13)	0.0226(14)	0.0387(17)	0.0029(13)	0.0070(13)	-0.0028(11)
C9	0.0190(13)	0.0227(14)	0.0324(16)	0.0052(12)	-0.0030(12)	-0.0038(11)
C10	0.0220(13)	0.0216(13)	0.0213(14)	0.0004(11)	-0.0035(11)	-0.0071(11)
C11	0.0158(12)	0.0230(13)	0.0148(13)	0.0007(11)	0.0027(10)	-0.0027(10)
C12	0.0148(12)	0.0287(14)	0.0173(13)	0.0015(11)	0.0033(10)	-0.0054(11)
C13	0.0188(13)	0.0338(15)	0.0200(14)	0.0064(12)	-0.0015(11)	-0.0015(11)
C14	0.0217(13)	0.0226(14)	0.0241(15)	0.0055(11)	0.0063(11)	0.0008(11)
C15	0.0231(13)	0.0269(14)	0.0239(14)	0.0011(12)	0.0013(11)	-0.0086(11)
C16	0.0168(12)	0.0240(14)	0.0216(14)	0.0011(11)	-0.0010(11)	-0.0028(10)
C17	0.0196(13)	0.0201(13)	0.0166(13)	0.0027(11)	-0.0002(10)	-0.0060(10)
C18	0.0216(13)	0.0305(15)	0.0226(14)	-0.0064(12)	0.0032(11)	-0.0057(11)
C19	0.0207(13)	0.0435(17)	0.0287(15)	-0.0049(13)	0.0039(12)	-0.0118(12)
C20	0.0259(14)	0.0369(16)	0.0321(16)	0.0009(13)	-0.0062(12)	-0.0177(12)
C21	0.0340(15)	0.0239(14)	0.0284(15)	-0.0070(12)	0.0008(12)	-0.0114(12)
C22	0.0220(13)	0.0237(14)	0.0240(14)	-0.0026(12)	0.0027(11)	-0.0059(11)
C23	0.0145(12)	0.0208(13)	0.0196(13)	-0.0006(11)	0.0007(10)	-0.0074(10)

# Experimenteller Teil

C24	0.0187(12)	0.0196(13)	0.0204(13)	0.0032(11)	0.0015(10)	-0.0072(10)
C25	0.0202(13)	0.0247(14)	0.0213(14)	-0.0059(11)	0.0028(11)	-0.0096(11)
C26	0.0241(13)	0.0275(14)	0.0201(14)	-0.0025(12)	0.0012(11)	-0.0114(11)
C27	0.0223(13)	0.0246(14)	0.0203(14)	0.0038(11)	-0.0013(11)	-0.0096(11)
C28	0.0186(12)	0.0207(13)	0.0217(14)	-0.0025(11)	0.0008(11)	-0.0072(11)
B1	0.0248(17)	0.0250(18)	0.032(2)	-0.0022(15)	-0.0011(14)	-0.0096(14)
B1A	0.031(3)	0.020(3)	0.021(3)	0.000(2)	-0.001(3)	-0.009(3)
B1B	0.023(3)	0.020(3)	0.033(4)	-0.002(3)	0.001(3)	-0.004(3)
B2	0.0203(15)	0.0271(17)	0.0238(17)	-0.0004(14)	0.0025(13)	-0.0052(13)

**Table 10:** Hydrogen coordinates and isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2$ ) for **93**.

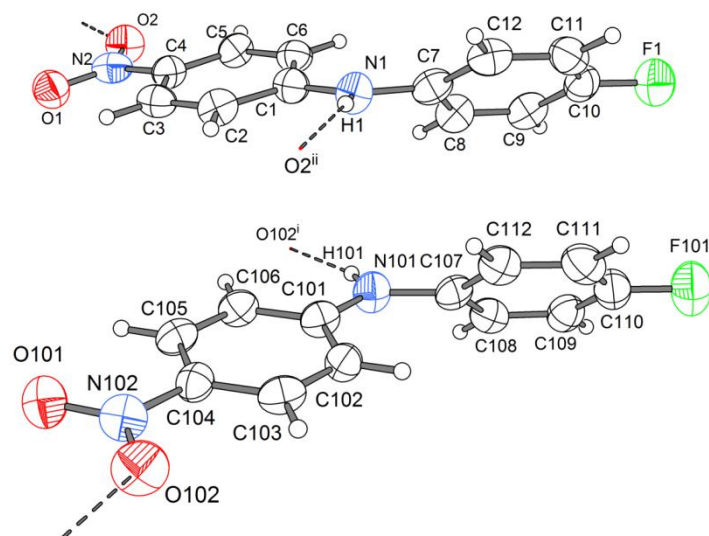
	x	y	z	U(eq)	Occupancy
H1A	0.2796	0.0055	0.5048	0.020	0.50
H1B	0.2137	0.0092	0.5088	0.021	0.50
H1BC	0.3074	0.1433	0.6167	0.031	0.50
H1BD	0.1323	0.1884	0.6352	0.031	0.50
H1AA	0.1136	0.1685	0.6172	0.031	0.50
H1AB	0.2779	0.1688	0.6364	0.031	0.50
H2A	0.3287	-0.0978	0.6575	0.026	1
H2B	0.1535	-0.0722	0.6596	0.026	1
H3BC	0.2766	0.2515	0.4928	0.032	0.50
H3BD	0.1012	0.2901	0.4857	0.032	0.50
H3AA	0.2405	0.2923	0.4888	0.032	0.50
H3AB	0.0890	0.2484	0.4884	0.032	0.50
H4A	0.1561	0.1295	0.3601	0.026	1
H4B	0.3197	0.1497	0.3623	0.026	1
H6	0.0735	0.0950	0.9389	0.025	1
H7	-0.1717	0.1936	0.9866	0.031	1
H8	-0.3606	0.2441	0.8908	0.034	1
H9	-0.3065	0.2027	0.7475	0.030	1
H10	-0.0624	0.1032	0.6992	0.026	1
H12	0.4586	-0.1541	0.8865	0.025	1
H13	0.5318	-0.3961	0.9375	0.031	1
H14	0.3922	-0.5576	0.9126	0.029	1
H15	0.1701	-0.4739	0.8428	0.029	1
H16	0.0960	-0.2337	0.7916	0.026	1
H18	0.4534	0.3602	0.2744	0.030	1
H19	0.6252	0.4788	0.3137	0.037	1
H20	0.5607	0.6589	0.4152	0.036	1
H21	0.3225	0.7227	0.4757	0.034	1
H22	0.1492	0.6064	0.4370	0.028	1
H24	0.2556	0.1215	0.2150	0.023	1
H25	0.2663	0.0970	0.0679	0.026	1
H26	0.1955	0.3037	-0.0204	0.028	1
H27	0.1164	0.5370	0.0366	0.026	1
H28	0.1015	0.5625	0.1829	0.024	1
H1AC	-0.0365	0.0715	0.5244	0.035	0.50
H1AD	0.0715	-0.0892	0.5394	0.035	0.50
H1AE	0.0555	-0.0162	0.4463	0.035	0.50
H1BA	0.4951	0.0639	0.5122	0.039	0.50
H1BB	0.4501	-0.0393	0.4467	0.039	0.50

# Experimenteller Teil

H1BE	0.4676	-0.0890	0.5442	0.039	0.50
H1C	0.457(3)	0.064(3)	0.7805(17)	0.041(8)	1
H1D	0.358(3)	0.120(3)	0.8845(18)	0.036(7)	1
H1E	0.306(3)	0.233(3)	0.7843(16)	0.029(7)	1
H2C	-0.053(3)	0.500(3)	0.4280(19)	0.045(8)	1
H2D	-0.108(2)	0.380(3)	0.3478(14)	0.021(6)	1
H2E	-0.082(3)	0.565(3)	0.3138(16)	0.025(7)	1

**Table 11:** Torsion angles [°] for **93**.

C3-N1B-C1-C2	161.7(3)	Symmetry transformations used to generate	
B1B-N1B-C1-C2	-64.7(5)	equivalent atoms:	
C3-N1B-C1-N1A	73.8(9)	C5-P1-C11-C12	-132.74(19)
B1B-N1B-C1-N1A	-152.6(12)	C2-P1-C11-C12	115.4(2)
C3-N1A-C1-N1B	-72.3(9)	B1-P1-C11-C12	-6.5(2)
B1A-N1A-C1-N1B	156.6(12)	C16-C11-C12-C13	1.7(3)
C3-N1A-C1-C2	-174.8(3)	P1-C11-C12-C13	-174.03(19)
B1A-N1A-C1-C2	54.1(5)	C11-C12-C13-C14	0.1(4)
N1B-C1-C2-P1	164.8(2)	C12-C13-C14-C15	-1.9(4)
N1A-C1-C2-P1	-168.3(2)	C13-C14-C15-C16	1.9(4)
C5-P1-C2-C1	77.7(2)	C14-C15-C16-C11	-0.1(4)
C11-P1-C2-C1	-172.45(18)	C12-C11-C16-C15	-1.7(4)
B1-P1-C2-C1	-49.9(2)	P1-C11-C16-C15	173.96(19)
C1-N1A-C3-N1B	69.4(8)	C23-P2-C17-C22	142.6(2)
B1A-N1A-C3-N1B	-159.7(12)	C4-P2-C17-C22	-104.8(2)
C1-N1A-C3-C4	164.8(3)	B2-P2-C17-C22	18.4(3)
B1A-N1A-C3-C4	-64.3(5)	C23-P2-C17-C18	-40.2(2)
C1-N1B-C3-N1A	-76.9(8)	C4-P2-C17-C18	72.4(2)
B1B-N1B-C3-N1A	150.4(12)	B2-P2-C17-C18	-164.5(2)
C1-N1B-C3-C4	-172.5(3)	C22-C17-C18-C19	0.1(4)
B1B-N1B-C3-C4	54.8(5)	P2-C17-C18-C19	-177.1(2)
N1A-C3-C4-P2	160.5(2)	C17-C18-C19-C20	0.3(4)
N1B-C3-C4-P2	-171.9(2)	C18-C19-C20-C21	-0.5(4)
C23-P2-C4-C3	-179.78(17)	C19-C20-C21-C22	0.4(4)
C17-P2-C4-C3	67.71(19)	C20-C21-C22-C17	0.0(4)
B2-P2-C4-C3	-58.1(2)	C18-C17-C22-C21	-0.2(4)
C11-P1-C5-C10	-112.4(2)	P2-C17-C22-C21	176.9(2)
C2-P1-C5-C10	-4.2(2)	C17-P2-C23-C28	-68.2(2)
B1-P1-C5-C10	122.2(2)	C4-P2-C23-C28	-179.65(18)
C11-P1-C5-C6	66.9(2)	B2-P2-C23-C28	58.6(2)
C2-P1-C5-C6	175.08(18)	C17-P2-C23-C24	114.66(19)
B1-P1-C5-C6	-58.5(2)	C4-P2-C23-C24	3.2(2)
C10-C5-C6-C7	-0.2(3)	B2-P2-C23-C24	-118.5(2)
P1-C5-C6-C7	-179.47(18)	C28-C23-C24-C25	-1.2(3)
C5-C6-C7-C8	0.4(4)	P2-C23-C24-C25	175.90(17)
C6-C7-C8-C9	-0.8(4)	C23-C24-C25-C26	0.6(3)
C7-C8-C9-C10	0.9(4)	C24-C25-C26-C27	0.5(3)
C8-C9-C10-C5	-0.7(4)	C25-C26-C27-C28	-1.0(3)
C6-C5-C10-C9	0.3(3)	C26-C27-C28-C23	0.5(3)
P1-C5-C10-C9	179.59(19)	C24-C23-C28-C27	0.6(3)
C5-P1-C11-C16	51.6(2)	P2-C23-C28-C27	-176.64(17)
C2-P1-C11-C16	-60.3(2)		
B1-P1-C11-C16	177.8(2)		

Crystal data of 4-Fluoro-*N*-(4-nitrophenyl)aniline (**120**)**Fig. 37:** Crystal structure of 4-Fluoro-*N*-(4-nitrophenyl)aniline **120**

Habitus, colour	plate, pale yellow		
Crystal size	0.200 x 0.140 x 0.050 mm <sup>3</sup>		
Crystal system	Orthorhombic		
Space group	P b c a		Z = 16
Unit cell dimensions	a = 15.0023(10) Å		α= 90°.
	b = 13.1069(8) Å		β= 90°.
	c = 21.2388(14) Å		γ = 90°.
Volume	4176.3(5) Å <sup>3</sup>		
Cell determination	4064 peaks with Theta 1.9 to 23.2°.		
Empirical formula	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> F N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
Formula weight	232.21		
Density (calculated)	1.477 Mg/m <sup>3</sup>		
Absorption coefficient	0.115 mm <sup>-1</sup>		
F(000)	1920		
Data collection:			
Diffractometer type	STOE IPDS 2		
Wavelength	0.71073 Å		
Temperature	100(2) K		
Theta range for data collection	1.92 to 25.25°.		

## Experimenteller Teil

Index ranges	-17<=h<=18, -14<=k<=15, -25<=l<=22
Data collection software	STOE X-AREA
Cell refinement software	STOE X-AREA
Data reduction software	STOE X-RED
Solution and refinement:	
Reflections collected	18424
Independent reflections	3775 [R(int) = 0.1334]
Completeness to theta = 25.25°	100.0 %
Observed reflections	1313 [I>2sigma(I)]
Reflections used for refinement	3775
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	1.1541 and 0.9135
Largest diff. peak and hole	0.158 and -0.143 e.Å <sup>-3</sup>
Solution	Direct methods
Refinement	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Treatment of hydrogen atoms	Calculated positions, constr. ref.
Programs used	SIR2011 SHELXL-97 (Sheldrick, 1997) DIAMOND 3.2h STOE IPDS2 software
Data / restraints / parameters	3775 / 0 / 307
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	0.772
R index (all data)	wR2 = 0.1022
R index conventional [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0458

# Experimenteller Teil

**Table 12:** Atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2$ ) for **120**.  $U(\text{eq})$  is defined as one third of the trace of the orthogonalized  $U_{ij}$  tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$	Occupancy
C101	0.2794(2)	0.6351(3)	0.3247(2)	0.0391(11)	1
C102	0.1873(2)	0.6240(3)	0.33556(19)	0.0392(11)	1
C103	0.1292(3)	0.6246(3)	0.2862(2)	0.0433(12)	1
C104	0.1597(3)	0.6355(3)	0.2248(2)	0.0374(11)	1
C105	0.2507(3)	0.6473(3)	0.2128(2)	0.0417(12)	1
C106	0.3089(3)	0.6468(3)	0.2620(2)	0.0411(12)	1
C107	0.3262(2)	0.6275(4)	0.4375(2)	0.0412(12)	1
C108	0.3781(2)	0.5599(3)	0.4730(3)	0.0436(12)	1
C109	0.3688(3)	0.5560(4)	0.5375(2)	0.0476(13)	1
C110	0.3070(3)	0.6180(4)	0.5656(2)	0.0512(13)	1
C111	0.2545(3)	0.6853(4)	0.5320(2)	0.0513(13)	1
C112	0.2650(2)	0.6905(3)	0.4672(2)	0.0447(12)	1
N101	0.34115(19)	0.6327(3)	0.37159(16)	0.0449(9)	1
N102	0.0975(2)	0.6374(3)	0.1742(2)	0.0472(10)	1
O101	0.12459(17)	0.6518(2)	0.11973(15)	0.0535(8)	1
O102	0.01755(17)	0.6234(2)	0.18561(14)	0.0573(9)	1
F101	0.29716(13)	0.6121(2)	0.62927(12)	0.0703(9)	1
C1	0.4642(2)	0.8846(3)	0.3241(2)	0.0407(11)	1
C2	0.4332(3)	0.8743(3)	0.2618(2)	0.0420(12)	1
C3	0.4903(2)	0.8720(3)	0.2119(2)	0.0416(12)	1
C4	0.5817(2)	0.8824(3)	0.2230(2)	0.0379(11)	1
C5	0.6141(3)	0.8953(3)	0.2834(2)	0.0404(12)	1
C6	0.5565(2)	0.8963(3)	0.3329(2)	0.0412(11)	1
C7	0.4191(3)	0.8800(4)	0.4377(2)	0.0443(13)	1
C8	0.4840(3)	0.8161(3)	0.4632(2)	0.0462(12)	1
C9	0.4921(3)	0.8067(3)	0.5281(2)	0.0457(12)	1
C10	0.4354(3)	0.8592(4)	0.5656(2)	0.0454(12)	1
C11	0.3680(3)	0.9215(3)	0.5426(2)	0.0458(13)	1
C12	0.3610(3)	0.9319(3)	0.4779(2)	0.0456(13)	1
N1	0.40339(19)	0.8867(3)	0.37198(16)	0.0418(9)	1
N2	0.6431(2)	0.8774(3)	0.1717(2)	0.0464(10)	1
O1	0.61454(17)	0.8626(2)	0.11729(15)	0.0520(8)	1
O2	0.72343(17)	0.8876(2)	0.18258(14)	0.0523(9)	1
F1	0.44143(13)	0.8487(2)	0.62962(12)	0.0596(8)	1

**Table 13:** Bond lengths [ $\text{\AA}$ ] and angles [ $^\circ$ ] for **120**.

C101-N101	1.361(5)	C106-H106	0.9500
C101-C102	1.409(5)	C107-C112	1.387(6)
C101-C106	1.411(6)	C107-C108	1.399(6)
C102-C103	1.363(5)	C107-N101	1.420(5)
C102-H102	0.9500	C108-C109	1.379(5)
C103-C104	1.389(7)	C108-H108	0.9500
C103-H103	0.9500	C109-C110	1.369(6)
C104-C105	1.398(5)	C109-H109	0.9500
C104-N102	1.423(5)	C110-F101	1.363(5)
C105-C106	1.360(6)	C110-C111	1.381(6)
C105-H105	0.9500	C111-C112	1.389(6)

# Experimenteller Teil

C111-H111	0.9500	C6-H6	0.9500
C112-H112	0.9500	C7-C8	1.393(6)
N101-H101	0.8800	C7-C12	1.398(6)
N102-O102	1.237(4)	C7-N1	1.418(5)
N102-O101	1.241(4)	C8-C9	1.391(6)
C1-N1	1.366(5)	C8-H8	0.9500
C1-C6	1.407(5)	C9-C10	1.354(6)
C1-C2	1.409(6)	C9-H9	0.9500
C2-C3	1.364(6)	C10-F1	1.369(5)
C2-H2	0.9500	C10-C11	1.389(6)
C3-C4	1.398(5)	C11-C12	1.385(6)
C3-H3	0.9500	C11-H11	0.9500
C4-C5	1.381(6)	C12-H12	0.9500
C4-N2	1.429(5)	N1-H1	0.8800
C5-C6	1.360(5)	N2-O2	1.234(4)
C5-H5	0.9500	N2-O1	1.249(4)
N101-C101-C102	123.0(4)	C107-N101-H101	116.0
N101-C101-C106	118.7(3)	O102-N102-O101	121.5(4)
C102-C101-C106	118.2(4)	O102-N102-C104	119.1(4)
C103-C102-C101	120.0(4)	O101-N102-C104	119.4(3)
C103-C102-H102	120.0	N1-C1-C6	123.8(4)
C101-C102-H102	120.0	N1-C1-C2	118.7(3)
C102-C103-C104	120.8(4)	C6-C1-C2	117.4(4)
C102-C103-H103	119.6	C3-C2-C1	121.7(4)
C104-C103-H103	119.6	C3-C2-H2	119.2
C103-C104-C105	120.2(4)	C1-C2-H2	119.2
C103-C104-N102	119.6(4)	C2-C3-C4	118.8(4)
C105-C104-N102	120.1(4)	C2-C3-H3	120.6
C106-C105-C104	119.1(4)	C4-C3-H3	120.6
C106-C105-H105	120.4	C5-C4-C3	120.9(4)
C104-C105-H105	120.4	C5-C4-N2	119.1(3)
C105-C106-C101	121.6(4)	C3-C4-N2	119.9(4)
C105-C106-H106	119.2	C6-C5-C4	119.7(4)
C101-C106-H106	119.2	C6-C5-H5	120.2
C112-C107-C108	120.2(4)	C4-C5-H5	120.2
C112-C107-N101	121.5(4)	C5-C6-C1	121.5(4)
C108-C107-N101	118.3(4)	C5-C6-H6	119.3
C109-C108-C107	120.1(4)	C1-C6-H6	119.3
C109-C108-H108	120.0	C8-C7-C12	119.4(5)
C107-C108-H108	120.0	C8-C7-N1	122.4(4)
C110-C109-C108	118.6(5)	C12-C7-N1	117.9(4)
C110-C109-H109	120.7	C9-C8-C7	120.1(4)
C108-C109-H109	120.7	C9-C8-H8	120.0
F101-C110-C109	118.1(5)	C7-C8-H8	120.0
F101-C110-C111	119.1(4)	C10-C9-C8	118.9(4)
C109-C110-C111	122.7(4)	C10-C9-H9	120.6
C110-C111-C112	118.6(4)	C8-C9-H9	120.6
C110-C111-H111	120.7	C9-C10-F1	119.4(4)
C112-C111-H111	120.7	C9-C10-C11	123.3(4)
C107-C112-C111	119.7(4)	F1-C10-C11	117.2(4)
C107-C112-H112	120.2	C12-C11-C10	117.6(4)
C111-C112-H112	120.2	C12-C11-H11	121.2
C101-N101-C107	128.0(3)	C10-C11-H11	121.2
C101-N101-H101	116.0	C11-C12-C7	120.7(4)

# Experimenteller Teil

C11-C12-H12	119.6	C7-N1-H1	115.8
C7-C12-H12	119.6	O2-N2-O1	121.7(4)
C1-N1-C7	128.3(3)	O2-N2-C4	118.8(4)
C1-N1-H1	115.8	O1-N2-C4	119.5(3)

**Table 14:** Anisotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2$ ) for **120**. The anisotropic displacement factor exponent takes the form:  $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U <sup>11</sup>	U <sup>22</sup>	U <sup>33</sup>	U <sup>23</sup>	U <sup>13</sup>	U <sup>12</sup>
C101	0.031(2)	0.039(3)	0.047(3)	0.001(3)	0.004(2)	0.001(2)
C102	0.039(2)	0.040(3)	0.038(3)	0.002(3)	0.001(2)	-0.001(2)
C103	0.037(2)	0.035(3)	0.058(4)	0.002(3)	0.002(2)	0.000(2)
C104	0.041(2)	0.034(3)	0.037(3)	0.002(2)	0.003(2)	0.004(2)
C105	0.037(2)	0.038(3)	0.049(3)	0.004(3)	0.006(2)	-0.002(2)
C106	0.028(2)	0.046(3)	0.049(3)	0.003(3)	0.001(2)	-0.004(2)
C107	0.029(2)	0.048(3)	0.047(3)	0.002(3)	0.006(2)	-0.011(2)
C108	0.033(2)	0.045(3)	0.053(4)	-0.006(3)	0.002(2)	0.000(2)
C109	0.042(3)	0.054(3)	0.047(4)	0.006(3)	-0.002(2)	-0.007(2)
C110	0.043(3)	0.068(4)	0.042(3)	-0.006(3)	0.002(2)	-0.016(3)
C111	0.040(3)	0.056(3)	0.058(4)	-0.012(3)	0.002(2)	-0.005(2)
C112	0.029(2)	0.051(3)	0.054(4)	-0.002(3)	0.000(2)	-0.003(2)
N101	0.0297(17)	0.060(3)	0.045(2)	0.001(2)	0.0017(17)	-0.0027(17)
N102	0.043(2)	0.047(3)	0.052(3)	-0.001(2)	0.000(2)	0.004(2)
O101	0.0555(18)	0.060(2)	0.045(2)	-0.0014(18)	0.0004(16)	0.0062(16)
O102	0.0320(16)	0.070(2)	0.070(2)	0.003(2)	-0.0041(15)	0.0016(17)
F101	0.0551(15)	0.106(2)	0.049(2)	-0.0024(18)	0.0017(13)	-0.0049(15)
C1	0.039(2)	0.040(3)	0.042(3)	0.001(3)	-0.007(2)	0.002(2)
C2	0.031(2)	0.043(3)	0.052(3)	0.004(3)	-0.002(2)	0.003(2)
C3	0.037(2)	0.036(3)	0.052(3)	-0.002(3)	-0.008(2)	0.001(2)
C4	0.033(2)	0.039(3)	0.042(3)	-0.001(3)	0.011(2)	0.000(2)
C5	0.031(2)	0.044(3)	0.047(3)	0.004(2)	0.005(2)	0.000(2)
C6	0.042(2)	0.037(3)	0.045(3)	0.001(2)	-0.006(2)	-0.002(2)
C7	0.035(2)	0.043(3)	0.055(4)	0.007(3)	0.001(2)	-0.005(2)
C8	0.039(2)	0.048(3)	0.052(3)	0.003(3)	0.001(2)	0.006(2)
C9	0.031(2)	0.048(3)	0.058(3)	0.009(3)	-0.002(2)	0.000(2)
C10	0.044(3)	0.050(3)	0.042(3)	0.004(3)	0.001(2)	-0.011(2)
C11	0.041(3)	0.047(3)	0.050(4)	-0.009(3)	0.005(2)	-0.004(2)
C12	0.037(2)	0.039(3)	0.061(4)	0.002(2)	0.001(2)	0.002(2)
N1	0.0293(17)	0.053(3)	0.043(2)	0.005(2)	-0.0005(17)	0.0036(16)
N2	0.039(2)	0.036(2)	0.064(3)	0.001(2)	-0.007(2)	-0.0012(19)
O1	0.0514(17)	0.056(2)	0.048(2)	-0.0012(18)	-0.0017(16)	-0.0020(16)
O2	0.0333(16)	0.064(2)	0.060(2)	0.0006(19)	0.0038(14)	-0.0011(17)
F1	0.0511(14)	0.075(2)	0.052(2)	0.0012(17)	-0.0029(13)	0.0033(13)

**Table 15:** Hydrogen coordinates and isotropic displacement parameters ( $\text{\AA}^2$ ) for **120**.

	x	y	z	U(eq)	Occupancy
H102	0.1656	0.6162	0.3773	0.047	1
H103	0.0672	0.6173	0.2938	0.052	1
H105	0.2717	0.6556	0.1709	0.050	1



# Experimenteller Teil

H106	0.3708	0.6545	0.2539	0.049	1
H108	0.4198	0.5165	0.4525	0.052	1
H109	0.4046	0.5113	0.5620	0.057	1
H111	0.2121	0.7272	0.5529	0.062	1
H112	0.2303	0.7371	0.4432	0.054	1
H101	0.3973	0.6347	0.3596	0.054	1
H2	0.3710	0.8687	0.2544	0.050	1
H3	0.4684	0.8635	0.1702	0.050	1
H5	0.6762	0.9034	0.2903	0.048	1
H6	0.5792	0.9051	0.3743	0.049	1
H8	0.5226	0.7790	0.4362	0.055	1
H9	0.5368	0.7641	0.5459	0.055	1
H11	0.3282	0.9558	0.5702	0.055	1
H12	0.3161	0.9748	0.4606	0.055	1
H1	0.3473	0.8929	0.3606	0.050	1

**Table 16:** Torsion angles [°] for **120**.

N101-C101-C102-C103	-178.3(4)	Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:	
C106-C101-C102-C103	0.2(7)		
C101-C102-C103-C104	0.2(7)	C4-C5-C6-C1	-0.1(7)
C102-C103-C104-C105	-0.7(7)	N1-C1-C6-C5	-178.9(4)
C102-C103-C104-N102	-179.0(4)	C2-C1-C6-C5	-1.5(7)
C103-C104-C105-C106	0.7(7)	C12-C7-C8-C9	-1.9(6)
N102-C104-C105-C106	179.0(4)	N1-C7-C8-C9	-175.1(4)
C104-C105-C106-C101	-0.3(7)	C7-C8-C9-C10	1.0(7)
N101-C101-C106-C105	178.4(4)	C8-C9-C10-F1	178.5(4)
C102-C101-C106-C105	-0.2(7)	C8-C9-C10-C11	0.9(7)
C112-C107-C108-C109	-0.3(6)	C9-C10-C11-C12	-1.9(7)
N101-C107-C108-C109	176.8(4)	F1-C10-C11-C12	-179.5(4)
C107-C108-C109-C110	1.2(6)	C10-C11-C12-C7	0.9(7)
C108-C109-C110-F101	178.7(4)	C8-C7-C12-C11	0.9(7)
C108-C109-C110-C111	-1.1(7)	N1-C7-C12-C11	174.4(4)
F101-C110-C111-C112	-179.9(4)	C6-C1-N1-C7	-13.7(7)
C109-C110-C111-C112	-0.1(7)	C2-C1-N1-C7	168.9(4)
C108-C107-C112-C111	-0.9(6)	C8-C7-N1-C1	-38.2(7)
N101-C107-C112-C111	-177.9(4)	C12-C7-N1-C1	148.5(4)
C110-C111-C112-C107	1.1(6)	C5-C4-N2-O2	-2.0(6)
C102-C101-N101-C107	-5.4(7)	C3-C4-N2-O2	179.4(4)
C106-C101-N101-C107	176.1(4)	C5-C4-N2-O1	177.8(4)
C112-C107-N101-C101	-47.4(7)	C3-C4-N2-O1	-0.8(6)
C108-C107-N101-C101	135.6(4)		
C103-C104-N102-O102	-4.1(6)		
C105-C104-N102-O102	177.6(4)		
C103-C104-N102-O101	176.8(4)		
C105-C104-N102-O101	-1.5(6)		
N1-C1-C2-C3	179.8(4)		
C6-C1-C2-C3	2.3(7)		
C1-C2-C3-C4	-1.4(7)		
C2-C3-C4-C5	-0.3(7)		
C2-C3-C4-N2	178.3(4)		
C3-C4-C5-C6	1.1(7)		
N2-C4-C5-C6	-177.5(4)		

**Table 17:** Hydrogen bonds for **120** [ $\text{\AA}$  and  $^\circ$ ].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N101-H101...O102#1	0.88	2.05	2.914(4)	167.4
N1-H1...O2#2	0.88	2.07	2.938(4)	167.5

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1  $x+1/2, y, -z+1/2$  #2  $x-1/2, y, -z+1/2$

**9 Literaturverzeichnis**

- [1] W. Carruthers, I. Coldham, *Modern Methods of Organic Synthesis*, **2004**, Cambridge (UK): Cambridge University Press; S. 417f.
- [2] M. E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306-307.
- [3] A. N. Ajjou, H. Alper, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1466-1468.
- [4] C. M. Thomas, T. R. Ward, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 337-346.
- [5] A. Pordea, T. R. Ward, *Synlett* **2009**, *20*, 3225-3236.
- [6] Y. Lu, N. Yeung, N. Sieracki, N. M. Marshall, *Nature* **2009**, *460*, 855-862.
- [7] T. Heinisch, T. R. Ward, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 184-199.
- [8] F. Rosati, G. Roelfes, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 916-927.
- [9] M. R. Ringenberg, T. R. Ward, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8470-8476.
- [10] T. R. Ward, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 47-57.
- [11] P. J. Deuss, R. de Heeten, W. Laan, P. C. J. Kamer, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4680-4698.
- [12] M. Creus, T. R. Ward, *Progress in Inorganic Chemistry* **2011**, *57*, 203-253.
- [13] J. C. Lewis, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2954-2975.
- [14] M. Skander, N. Humbert, J. Collot, J. Gradinaru, G. Klein, A. Loosli, J. Sauser, A. Zocchi, F. Gilardoni, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14411-14411.
- [15] E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, *Science* **1984**, *226*, 505-511.
- [16] Q. Jing, K. Okrasa, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1370-1376.
- [17] R. G. Nuzzo, S. L. Haynie, M. E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2861-2867.
- [18] M. T. Reetz, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5767-5778.
- [19] M. T. Reetz, J. J.-P. Peyralans, A. Maichele, Y. Fu, M. Maywald, *Chem. Commun.* **2006**, 4318-4320.
- [20] G. Klein, N. Humbert, J. Gradinaru, A. Ivanova, F. Gilardoni, U. E. Rusbandi, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7764-7767.

- [21] M. T. Reetz, M. Rentzsch, A. Pletsch, A. Taglieber, F. Hollmann, R. J. G. Mondière, N. Dickmann, B. Höcker, S. Cerrone, M. C. Haeger, R. Sterner, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 552-564.
- [22] J. Pierron, C. Malan, M. Creus, J. Gradinaru, I. Hafner, A. Ivanova, A. Sardo, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 701-705.
- [23] C. Letondor, N. Humbert, T. R. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4683-4687.
- [24] C. Letondor, A. Pordea, N. Humbert, A. Ivanova, S. Mazurek, M. Novic, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8320-8328.
- [25] M. Dürrenberger, T. Heinisch, Y. M. Wilson, T. Rossel, E. Nogueira, L. Knörr, A. Mutschler, K. Kersten, M. J. Zimbron, J. Pierron, T. Schirmer, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3026-3029.
- [26] J. M. Zimbron, T. Heinisch, M. Schmid, D. Hamels, E. S. Nogueira, T. Schirmer, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5384-5388.
- [27] M. T. Reetz, N. Jiao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2416-2419.
- [28] F. W. Monnard, T. Heinisch, E. S. Nogueira, T. Schirmer, T. R. Ward, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8238-8240.
- [29] K. Okrasa, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1587-1596.
- [30] Q. Jing, R. J. Kazlauskas, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 953-957.
- [31] M. T. Reetz, M. Rentzsch, A. Pietsch, M. Maywald, *Chimia* **2002**, *56*, 721-723.
- [32] W. Laan, B. K. Muñoz, R. den Heeten, P. C. J. Kamer, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1236-1239.
- [33] R. den Heeten, B. K. Muñoz, G. Popa, W. Laan, P. C. J. Kamer, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 8477-8483.
- [34] P. J. Deuss, G. Popa, C. H. Botting, W. Laan, P. C. J. Kamer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5315-5317.
- [35] H. Yang, P. Srivastava, C. Zhang, J. C. Lewis, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 223-227.
- [36] M. L. Zastrow, A. F. A. Peacock, J. A. Stuckey, V. L. Pecoraro, *Nature Chemistry* **2012**, *4*, 118-123.
- [37] G. Roelfes, A. J. Boersma, B. L. Feringa, *Chem. Commun.* **2006**, 635-637.
- [38] A. J. Boersma, J. E. Klijn, B. L. Feringa, G. Roelfes, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11783-11790.

- [39] A. Liljas, K. Kannan, P.-C. Bergstén, I. Warra, K. Fridborg, B. Strandberg, U. Carlbom, L. Järup, S. Lövgren, M. Petef, *Nature New Biol.* **1972**, *235*, 131-137.
- [40] D. N Silverman, C. Tu, G. C. Wynns, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 4428-4435.
- [41] R. G. Khalifah, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 2561-2573.
- [42] J. Schulze Wischeler, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **2010**.
- [43] J. Schulze Wischeler, D. Sun, N. U. Sandner, U. Linne, A. Heine, U. Koert, G. Klebe, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5842-5851.
- [44] R. Corradini, A. Dossena, R. Marchelli, A. Panagia, G. Sartor, M. Saviano, A. Lombardi, V. Pavone, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 373-381.
- [45] D. B. G. Williams, P. D. R. Kotze, A. C. Ferreira, C. W. Holzapfel, *J. Iran. Chem. Soc.* **2011**, *8*, 240-246.
- [46] C. A. Busacca, E. Farber, J. DeYoung, S. Campbell, N. C. Gonnella, N. Grinberg, N. Haddad, N. Lee, S. Ma, D. Reeves, S. Shen, C. H. Senanayake, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5594-5597.
- [47] H. Lebel, S. Morin, V. Paquet, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2347-2349.
- [48] K. Issleib, R. Kümmel, H. Oehme, I. Meißner, *Chem. Ber.* **1968**, *101*, 3612-3618.
- [49] A. Courtin, *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 68-75.
- [50] F. Bitterer, O. Herd, A. Hessler, M. Kühnel, K. Rettig, O. Stelzer, W. S. Sheldrick, S. Nagel, N. Rösch, *Inorg. Chem.* **1996**, *41*, 4103-4113.
- [51] V. P. Morchala, B. Colasson, L. V. Lee, S. Röper, K. B. Sharpless, C.-H. Wong, H. C. Kolb, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 116-120.
- [52] D. Rideout, *Science* **1986**, *233*, 561-563.
- [53] R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2494-2507.
- [54] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [55] G. C. Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. A. Genazzani, *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 278-308.
- [56] L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. Jia, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998-15999.
- [57] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Medal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [58] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.

- [59] A. Krasinski, Z. Radić, R. Manetsch, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6686-6692.
- [60] V. P. Mocharla, B. Colasson, L. V. Lee, S. Röper, K. B. Sharpless, C.-H. Wong, H. C. Kolb, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 116-120.
- [61] D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9367-9372.
- [62] Y. Pocker, J. T. Stone, *Biochemistry* **1967**, *6*, 668-678.
- [63] M. F. Surgrue, A. Harris, I. Adamsons, *Drugs Today* **1997**, *33*, 283-298.
- [64] W. C. Still, M. Kahn, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [65] A. T. Brünger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J.-S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren, *Acta Crystallogr., Sect D: Biol. Crystallogr.* **1998**, *54*, 905-921.
- [66] G. M. Sheldrick, T. R. Schneider, *Methods Enzymol.* **1997**, *277*, 319-343.
- [67] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr., Sect D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126-2132.
- [68] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283-291.